



Las manchas negras de la cueva de Lascaux:

Origen, evolución y
caracterización de
un brote fúngico

Pedro María Martín Sánchez

Todos los derechos reservados. La totalidad o una parte de este libro no puede ser reproducida o utilizada en cualquier forma o medio, electrónico o mecánico, incluyendo copias o grabaciones o por cualquier medio de almacenar información y sistema de recuperación, sin previo permiso por escrito del IRNAS-CSIC.

© Pedro María Martín Sánchez

Diseño y maquetación: Pedro María Martín Sánchez

Portada: Fotografía del panel izquierdo de la Sala de los Toros, © Ministerio de Cultura y Comunicación, Francia. Diseño de Pedro María Martín Sánchez.

Editado por: Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, IRNAS-CSIC, España, Abril 2012.

I.S.B.N.: 978-84-695-3499-1

Impreso en España – Printed in Spain



**Las manchas negras de la cueva de Lascaux:
origen, evolución y caracterización de un brote fúngico**

Memoria que presenta

Pedro María Martín Sánchez

para optar al título de Doctor en Biología
por la Universidad de Sevilla

18 de Abril de 2012

**Las manchas negras de la cueva de Lascaux:
origen, evolución y caracterización de un brote fúngico**

Visado en Sevilla, a 18 de Abril de 2012

EL DIRECTOR



Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez

Profesor de Investigación
Instituto de Recursos Naturales
y Agrobiología de Sevilla
CSIC

LA TUTORA



Dra. Dña. Carolina Sousa Martín

Profesora Titular
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla

DOCTOR. D. CESÁREO SÁIZ JIMÉNEZ, PROFESOR DE
INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES
Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Las manchas negras de la cueva de Lascaux: origen, evolución y caracterización de un brote fúngico”, presentada por D. Pedro María Martín Sánchez para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en el Departamento de Geoecología, Biogeoquímica y Microbiología Ambiental, bajo mi dirección reuniendo todos los requisitos exigidos.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado

En Sevilla, a 18 de Abril de 2012



Fdo: Prof. Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez

DOCTOR D. JOSÉ MANUEL PARDO PRIETO, DIRECTOR DEL
INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE
SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Las manchas negras de la cueva de Lascaux: origen, evolución y caracterización de un brote fúngico”, presentada por D. Pedro María Martín Sánchez para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada en el Departamento de Geoecología, Biogeoquímica y Microbiología Ambiental, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

Y para que así conste se expide y firma el presente certificado

En Sevilla, a 18 de Abril de 2012

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters that appear to be 'JMP'.

Fdo: Dr. D. José Manuel Pardo Prieto

**El trabajo presentado en esta memoria
ha sido financiado por:**

Proyecto: “Écologie microbienne de la grotte de Lascaux”. Ministerio de Cultura y Comunicación, Francia.

Proyecto CONSOLIDER CSD2007-00058: “Programa de Investigación en Tecnologías para la conservación y revalorización del Patrimonio Cultural (TCP)”. Ministerio de Ciencia e Innovación, España.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Cesáreo Sáiz el haberme ofrecido la posibilidad de realizar esta Tesis Doctoral, gracias por tu confianza y reconocimiento durante estos años. Sin duda, tus directrices y aportaciones han hecho posible el desarrollo de esta investigación y la consecución de los objetivos marcados. Eres un ejemplo de dedicación científica, cualquiera que te conozca puede confirmarlo.

A Carolina Sousa, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Sevilla, por la ayuda prestada.

A todos los que han colaborado haciendo posible este trabajo:

Claude Alabouvette y Fabiola Bastian, del INRA de Dijon, responsables de las relaciones establecidas entre Sevilla-Dijon-Lascaux. Gracias por vuestra valiosa aportación: muestras, cepas, organización de muestreos, traducción, información de la cueva, etc.

El personal encargado de la conservación de la cueva de Lascaux: Muriel Mauriac, Sandrine Van Solinge, Stéphane Konik, Elena Man-Estier, Alina Moskalik-Detalle y el equipo de restauración, por su colaboración en los muestreos y la información aportada. Ha sido un verdadero placer trabajar en Lascaux, espero que los resultados obtenidos en esta investigación contribuyan a su conservación.

Alena Nováková, del ISB AS de la República Checa, por su colaboración en el estudio morfológico de los hongos, y su atención durante mi estancia en České Budějovice.

Santiago Sánchez y Eduardo López, del IEM-CSIC de Madrid, por los análisis SERS.

Mariona Hernández, de la Universidad de Barcelona, por los análisis TEM.

Mis compañeras, Ana, Valme y Estefanía, por su aportación a este trabajo, y su ayuda siempre que la he necesitado.

Gracias a todo el grupo de Microbiología y Patrimonio Cultural del IRNAS-CSIC de Sevilla, con los que he compartido estos últimos años. A los que ya estaban, por haberme acogido como lo hicieron y por su apoyo desde mis comienzos. A los que fueron llegando, por la alegría e ilusión que aportaron. A todos, por vuestra amistad y los buenos momentos vividos.

También quiero agradecer a mis antiguos compañeros fitopatólogos, Rosa, Tere y Eduardo, todo lo que me enseñaron. Sin duda, este trabajo se ha enriquecido con vuestras influencias.

Gracias a mi familia, por la educación que me ha dado, por su cariño y apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida.

Por último, me gustaría dedicar este trabajo a Laura, tú conoces mejor que nadie los esfuerzos realizados. Gracias por tus consejos, apoyo y sacrificio. Juntos hemos finalizado esta etapa, será un placer afrontar las siguientes a tu lado.

Publicaciones

Martin-Sanchez PM, Bastian F, Novákova A, Porca E, Jurado V, Sanchez-Cortes S, Lopez-Tobar E, García-Sánchez A, Ariza C, Hernández-Marine M, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C (2011). Écologie Microbienne de la Grotte de Lascaux. IRNAS-CSIC, España

Martin-Sanchez PM, Novákova A, Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C (2012). Two new species of the genus *Ochroconis*, *O. lascauxensis* and *O. anomala* isolated from black stains in Lascaux Cave, France. Fungal Biology 116: 574-589.

Martin-Sanchez PM, Nováková A, Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C (2012). Use of biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: The case of the Lascaux Cave in France. Environmental Science and Technology 46: 3762-3770.

Martin-Sanchez PM, Sanchez-Cortes S, Lopez-Tobar E, Jurado V, Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C (2012). The nature of black stains in Lascaux Cave, France, as revealed by surfaceenhanced Raman spectroscopy. Journal of Raman Spectroscopy 43: 464-467.

Martin-Sanchez PM, Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez. Real-time PCR detection of *Ochroconis lascauxensis* involved in the formation of black stains in the Lascaux Cave, France. Enviado a Science of the Total Environment.

Saiz-Jimenez C, Miller AZ, Martin-Sanchez PM, Hernandez-Marine M. Uncovering the origin of the black stains in Lascaux Cave in France. Enviado a Environmental Microbiology.

Índice de contenidos

Página

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN. LA CUEVA DE LASCAUX	1
Descripción de la cueva	2
Localización. Contexto geológico e hidrológico	2
Parámetros ambientales	5
Contexto arqueológico	6
Salas de la cueva y patrimonio artístico que albergan	7
Revisión histórica de los principales acontecimientos e investigaciones	12
Descubrimiento y exposición al turismo	12
Primera crisis bioclimática (1955-1970)	14
Aparente normalización bioclimática (1970-2001)	17
Segunda crisis biológica (2001-2006)	18
Tercera crisis biológica (2006-Actualidad)	24
Objetivos planteados	35
CAPÍTULO 2: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE <i>OCHROCONIS-SCOLECOBASIDIUM</i>	37
Introducción a los géneros <i>Ochroconis</i> y <i>Scolecobasidium</i>	38
Material y métodos	39
Identificación molecular de especies de <i>Ochroconis-Scolecobasidium</i>	39
Cepas estudiadas	39
Extracción de ADN genómico de cepas fúngicas	43
Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
Análisis de secuencias de ADN	46
Análisis filogenético	46
Identificación morfológica de especies de <i>Ochroconis-Scolecobasidium</i>	47
Caracterización de especies de <i>Ochroconis-Scolecobasidium</i>	49
Crecimiento a distintas temperaturas	49
Tolerancia al cloruro de benzalconio	49
Análisis de ácidos grasos	50

<i>Caracterización de fuentes de carbono</i>	52
<i>Caracterización de fuentes de nitrógeno</i>	55
<i>Enzimas degradativas</i>	55
Resultados y discusión	57
Identificación de especies de <i>Ochroconis-Scolecobasidium</i>	57
<i>Identificación molecular</i>	57
<i>Identificación morfológica</i>	67
Caracterización de especies de <i>Ochroconis</i>	77
<i>Crecimiento a distintas temperaturas</i>	77
<i>Tolerancia al cloruro de benzalconio</i>	78
<i>Análisis de ácidos grasos</i>	79
<i>Fuentes de carbono</i>	81
<i>Cloruro de benzalconio y sus productos de degradación como fuentes de carbono</i>	87
<i>Fuentes de nitrógeno</i>	88
<i>Enzimas degradativas</i>	90

CAPÍTULO 3. DISTRIBUCIÓN DE *OCHROCONIS LASCAUXENSIS* EN LA CUEVA DE LASCAUX

Material y métodos	94
Puesta a punto del protocolo de detección-cuantificación de <i>Ochroconis lascauxensis</i>	94
<i>Técnica de PCR a tiempo real</i>	94
<i>Cebadores específicos</i>	96
<i>Recta patrón</i>	97
Cuantificación de <i>Ochroconis lascauxensis</i> en muestras ambientales de la cueva de Lascaux	98
<i>Muestras analizadas</i>	98
<i>Extracción de ADN de muestras ambientales</i>	104
<i>Cuantificación de <i>Ochroconis lascauxensis</i></i>	104
Resultados y discusión	106
Puesta a punto del protocolo de detección-cuantificación de <i>Ochroconis lascauxensis</i>	106
<i>Especificidad de cebadores</i>	106

<i>Recta patrón</i>	108
Cuantificación de <i>Ochroconis lascauxensis</i> en muestras ambientales de la cueva de Lascaux	109
<i>Manchas negras recogidas en 2008 y 2009</i>	109
<i>Manchas recogidas en 2010</i>	110
<i>Muestras de sedimento y aire de 2010</i>	112
CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES FÚNGICAS DE LAS MANCHAS DE LA CUEVA DE LASCAUX	117
Material y métodos	118
Caracterización molecular de las comunidades fúngicas	118
<i>Muestras y análisis realizados</i>	118
<i>Extracción de ácidos nucleicos</i>	120
<i>Amplificación por PCR</i>	122
<i>Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)</i>	122
<i>Construcción de genotecas</i>	125
<i>Análisis de secuencias: clasificación en OTUs e identificación</i>	128
Aislamientos en medios de cultivo	130
<i>Muestras analizadas</i>	130
<i>Aislamientos</i>	131
Identificación y caracterización de hongos relevantes	133
<i>Identificación morfológica</i>	133
<i>Relaciones filogenéticas de “levaduras negras”</i>	133
<i>Tolerancia al cloruro de benzalconio</i>	134
<i>Capacidad de utilizar compuestos aromáticos como fuentes de carbono</i>	135
Resultados y discusión	138
Caracterización molecular por DGGE	138
<i>Cepas de hongos</i>	138
<i>Manchas negras recogidas en 2008 y 2009</i>	140
<i>Manchas recogidas en 2010</i>	143
<i>Muestras de aire recogidas en septiembre 2010</i>	147



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

LA CUEVA DE LASCAUX

Descripción de la cueva

Localización. Contexto geológico e hidrológico

La cueva de Lascaux está situada cerca de la localidad de Montignac (Francia), en la cuenca del río Vézère que cubre la zona sureste de la Dordoña, región septentrional del Perigord Negro (Fig. 1a).

En la parte central del río, su curso se caracteriza por una sucesión de meandros bordeados por elevadas cornisas calcáreas que determinan el paisaje de la zona. Antes de este modelado encajado, río arriba, en los alrededores de la cueva, cerca de Montignac, el relieve se suaviza dando lugar a un valle más amplio, con las orillas desprovistas de escarpados.

La colina de Lascaux se sitúa un tanto separada de las grandes concentraciones de cuevas ornadas y yacimientos descubiertos aguas abajo del río Vézère, alrededor de la pequeña localidad de Les Eyzies-de-Tayac. En esta zona se han registrado más de 37 cuevas y abrigos ornados, así como un número mucho más elevado de yacimientos de hábitats del Paleolítico Superior, establecidos al aire libre, bajo abrigos rocosos o a la entrada de las cavidades kársticas, siendo la zona con mayor densidad de yacimientos de Europa Occidental.

Los acantilados del Perigord, y sobre todo los del valle del río Vézère, corresponden a los pisos geológicos del Coniaciense Superior y del Santoniense Inferior, ambos pertenecientes al periodo Cretácico.

Dos fenómenos geológicos, relacionados con la disolución natural de la roca, marcaron profundamente este territorio originando la formación de numerosos abrigos y cuevas. Por un lado, la base de esta formación presenta un nivel muy poroso, lo que generó una disolución intensa a través de la alternancia de las acciones del hielo-deshielo. El resultado fue la formación de una larga incisión horizontal en los acantilados, presente en toda la zona encajada del río Vézère, originando los abrigos de los que el ser humano se apropió para residir. El otro fenómeno geológico relevante fue la presencia de un nivel muy karstificado en lo más alto del piso geológico, el cual dio origen a la formación de numerosas cuevas. Este nivel agrupa cerca del 85%

de las cavidades de la región, donde más de 400 cuevas han sido inventariadas. En el valle del Vézère, estas cuevas se hallan colgadas del acantilado y difícilmente accesibles, ya dismanteladas por la erosión, características que explican las pocas cavidades contabilizadas. En cambio, en la zona del río Beune, afluente principal del Vézère, el recorte de estos acantilados en escalones facilita el acceso y registro de las cuevas.

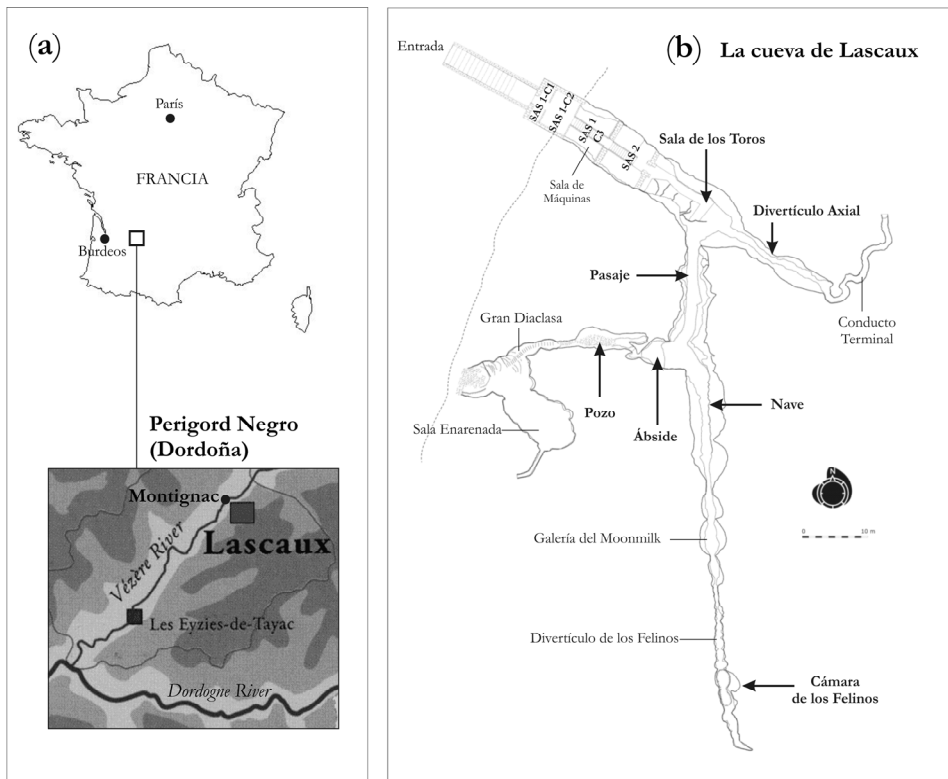


Figura 1. a. Localización de la cueva de Lascaux. b. Mapa de la cueva donde se detallan las distintas zonas.

La cueva de Lascaux se desarrolló por la erosión kárstica de las rocas calizas del piso geológico Coniaciense Superior. Este estrato geológico aflora por encima de la cueva, dejando a ambos lados los depósitos de arcillas y arenas que sustentan el bosque de robles, pinos y castaños que

ocupa la cima de la colina. Estos depósitos presentan abundantes vetas de óxidos de hierro y manganeso (Lastennet y col. 2011).

La zona de entrada a la cueva, cuando se descubrió en 1940, estaba totalmente bloqueada por depósitos sedimentarios milenarios, estando comunicada con el exterior por una pequeña grieta por donde se deslizaron los descubridores. Estos depósitos amortiguaban los efectos del clima exterior sobre la atmósfera interna, desempeñando la función de tampón térmico e hídrico. Poco después del descubrimiento, las obras de adaptación para las visitas eliminaron totalmente estos depósitos provocando el desequilibrio climático de la cueva (Geneste 2006).

En la roca donde se encaja la cueva se pueden apreciar ocho capas calcáreas superpuestas que se distinguen en función de la abundancia de aportes detríticos y del estado de compactación. Estratigráficamente, la sucesión de depósitos sedimentarios se vio alterada por la presencia de intercalaciones, tres de las cuales son visibles en la primera parte de la cueva. Las rocas calizas de las paredes son más compactas en la Sala de los Toros y Divertículo Axial, presentando diferentes estados de cohesión y rugosidad. La bóveda del Pasaje presenta areniscas calcáreas menos cimentadas. La roca conserva evidencias de múltiples episodios diagenéticos (disolución y precipitación), como manifiesta el relleno de las grietas de forma discontinua. En la Sala de los Toros en particular, el sustrato está cubierto por una concreción de carbonato de naturaleza similar a la roca adyacente.

Gran parte de la cueva está ocupada por los depósitos arcillosos, que componen las zonas bajas de las paredes, desarrollando unos bancos laterales en la mayoría de las galerías. Estos materiales son altamente reactivos debido a su elevada capacidad de retención del agua y de intercambio catiónico. El conjunto de las arcillas encontradas en las distintas zonas de la cueva tienen características similares, su análisis por difracción de rayos X puso de manifiesto la presencia caolinita, ilita y esmectita (Lastennet y col. 2011). Estos minerales son muy sensibles a las pequeñas variaciones climáticas provocándose fenómenos de expansión y contracción.

La colina de Lascaux es un macizo kárstico que presenta diversas salidas de agua. Aparecen algunas pequeñas fuentes en sus alrededores (“Bleue Font”, “Haute Fageotte”, “Régourdou”, “Madeleine” y “Fontaine Reynault”), por otro lado, hay que tener en cuenta la difusión del agua hacia los estratos inferiores del Coniaciense, aunque no debe ser muy relevante ya que estas capas son menos permeables. Los estudios de la zona indican que toda la cueva se puede considerar un sistema epikárstico, cuya salida principal de agua se sitúa a la altura de la tercera sala de entrada (SAS1-C3) (Fig. 1b). Esta salida no es única, ya que aparecen otros puntos de la cueva donde el agua se hace visible: Cámara de los Felinos, zona superior de la Galería del Moonmilk y otras zonas de intercalaciones (Fig. 1b). Las aguas que se recogen a nivel de SAS1-C3 son transportadas hasta un tanque situado en la sala de máquinas, desde donde se bombean al exterior.

Parámetros ambientales

El clima de la zona es principalmente de tipo oceánico. La pluviosidad es de grado medio, del orden de 880 mm/año, repartidos en dos épocas principales, otoño y primavera. La temperatura atmosférica media es de 12,6°C, con temperaturas medias que fluctúan entre los 3°C en invierno y los 20°C en verano. Sin embargo, la temperatura en el interior de la cueva es muy estable, con una media de 12,5°C, y una humedad relativa entorno al 99% (Oriol y col. 2011).

Los mecanismos responsables del equilibrio climático en el interior de la cueva son complejos. La situación de la cueva evoluciona de un modo natural; el seguimiento climático realizado desde 1963 muestra que durante seis meses al año el vapor del agua del aire se condensa sobre las paredes de la cueva, y el resto del año son posibles los procesos de evaporación. Estos mecanismos, provocados por los cambios de temperatura del aire y de la superficie de la roca, pueden causar la corrosión o el depósito de la calcita como resultado de la presencia de dióxido de carbono (Malaurent y col. 2011).

Contexto arqueológico

El Perigord conserva vestigios arqueológicos muy antiguos, que abarcan cerca de 350.000 años. Los principales yacimientos prehistóricos se desgranar a lo largo del valle del río Vézère: “La Madeleine”, “Le Moustier”, “La Micoque” y “Tayac”, éstos dieron respectivamente su nombre a las culturas materiales del Magdaleniense, Musteriense, Micoquiense, Tayaciense, y más tarde, del Perigordense. Otros yacimientos marcaron la investigación arqueológica, sobre todo “Laugerie-Haute” y “La Ferrassie”, que junto con “La Madeleine”, permitieron establecer la totalidad de la cronología del Paleolítico Superior, que en la actualidad, sirven aún de referencia para cualquier estudio sobre este período.

La cueva de Lascaux, desde su descubrimiento, ha gozado del reconocimiento mundial de la prensa y el público en general. Su patrimonio artístico es de excepcional calidad, compuesto por 1.963 presentaciones, con 915 figuras de animales y numerosos signos geométricos, según el inventario realizado por Aujoulat (2004). Reducir el valle del Vézère a un sólo lugar de interés sería injusto, pues existen numerosos lugares con pinturas rupestres y grabados notables: “Font de Gaume”, “Les Combarelles”, “Cap-Blanc”, etc. Sin embargo, ninguno de ellos ha ejercido tanta fascinación como Lascaux.

Se han realizado diferentes dataciones del patrimonio artístico que alberga la cueva de Lascaux. Inicialmente, Henry Breuil y Denis Peyrony lo relacionaron con la cultura material Gravetiense. Según Séverin Blanc, la mayoría de los indicios atribuían un origen Solutrense-Magdaleniense. Las primeras dataciones con radiocarbono se realizaron en los años 50 sobre fragmentos de carbones de madera encontrados en las zonas del Pasaje y del Pozo, obteniéndose unas edades comprendidas entre los 15.500 y los 17.190 años de antigüedad, que los situaba en la cultura Magdaleniense. Dos dataciones radiocarbónicas posteriores (1998 y 2002), a partir de fragmentos de varillas de cuerno de reno hallados en las excavaciones de Henri Breuil y Severin Blanc, establecieron una edad aproximada de 18.600-18.900 años de antigüedad. Esta época se sitúa en el límite de las culturas Solutrense

Superior y Magdaleniense Inferior (Geneste 2011). El análisis formal de las figuras encontradas en la cueva de Lascaux hace pensar que este arte pertenecería a la tradición Solutrense.

Salas de la cueva y patrimonio artístico que albergan

La cueva está compuesta por un conjunto de galerías accesibles al ser humano que no supera los 235 m de longitud. La cavidad se desarrolla en dirección paralela al eje principal del valle, lo que hace muy probable la existencia de varias entradas. El volumen total de la cueva es de $3.300 \pm 500 \text{ m}^3$ (Malaurent y col. 2011).

Tradicionalmente, la cueva se divide en siete sectores ornados, la Sala de los Toros, el Divertículo Axial, el Pasaje, el Ábside, la Nave, la Cámara de los Felinos y el Pozo (Figs. 1b y 2). En su distribución se distinguen claramente tres ejes. El primero asocia la zona de entrada (compuesta por cuatro vestíbulos: SAS1-C1, C2 y C3, y SAS2), la Sala de los Toros y el Divertículo Axial, con una longitud de unos 60 m. El segundo sería el eje derecho de la cueva, conectando la Sala de los Toros con el Pasaje, la Nave, la Galería del Moonmilk y el Divertículo de los Felinos, con una longitud de unos 110 m desde la entrada. Finalmente, el último eje parte del Ábside conectando con el Pozo y la Gran Diaclasa, más allá, un importante desprendimiento marca el cruce con la Sala Enarenada.

La entrada de la cueva se sitúa a 185 m de altitud, el suelo de la cavidad presenta cierta pendiente, con un desnivel de -13 m en la extremidad del Divertículo Axial y de -19 m en la parte baja del Pozo. El Pozo y la Cámara de los Felinos se sitúan a una profundidad respecto a la superficie topográfica de 24 y 25 metros, respectivamente.

La Sala de los Toros es una prolongación de la galería de entrada, siendo la sala de mayor tamaño (320 m^3), con una longitud de 20 m, una anchura que varía entre 5,5 y 7,5 m, y una altura máxima de 6 m (Fig. 2a). Las paredes situadas a ambos lados de la sala agrupan la casi totalidad de la decoración, que se desarrolla de manera continua sobre una treintena de

metros. La roca se encuentra frecuentemente cubierta por concreciones carbonatadas. Los motivos de esta sala son los más famosos de la cueva, considerados unos de los más imponentes de todo el arte paleolítico. Existen un total de 130 figuras en la sala, incluyendo 36 representaciones animales (17 caballos, 11 vacas y toros, seis ciervos, un uro, un oso y un “unicornio”) (Fig. 3a) y 50 signos geométricos.

El Divertículo Axial es un conducto de unos 30 m de longitud, situado a continuación de la Sala de los Toros (Fig. 2b). La decoración se distribuye cubriendo las dos paredes y la bóveda, agrupando 161 entidades gráficas: 58 representaciones figurativas, esencialmente de animales (vacas y toros, caballos, ciervos, íbices y un bisonte), 46 signos geométricos y 57 figuras indeterminadas que pueden vincularse a signos o esbozos de figuras animales (Fig. 3b,c).

El Pasaje es un pasillo de unos 20 m de longitud, que conecta la Sala de los Toros con el Ábside y la Nave (Fig. 2c). En él aparecen una gran cantidad de figuras, que a menudo son difíciles de interpretar. Se identificaron un total de 385 figuras grabadas o pintadas, entre ellas se distinguen numerosas figuras animales (caballos, bisontes, íbices, bóvidos y ciervos) y signos geométricos. Tras el Pasaje, la cueva se bifurca en dos, siguiendo el mismo eje discurre la Nave, la Galería del Moonmilk y el Divertículo de los Felinos, y a la derecha encontramos el Ábside que comunica con el Pozo. El Ábside y la Nave son salas mucho más amplias, con un volumen conjunto de 1.300 m³.

La Nave tiene una longitud de unos 20 m, presenta en su pared izquierda cuatro paneles situados a distintos niveles por la pendiente descendente de esta galería, en la pared derecha sólo aparece un panel (Fig. 2d). En la decoración de esta sala predominan las figuras animales (27 caballos, nueve íbices, seis ciervos, cinco bisontes, y un uro) (Fig. 3d,e), aunque también aparecen signos geométricos relevantes (blasones bajo la Gran Vaca Negra, Fig. 3d). Esta sala se estrecha considerablemente atravesando la Galería del Moonmilk, que recibe su nombre por las características formaciones geológicas de sus paredes.

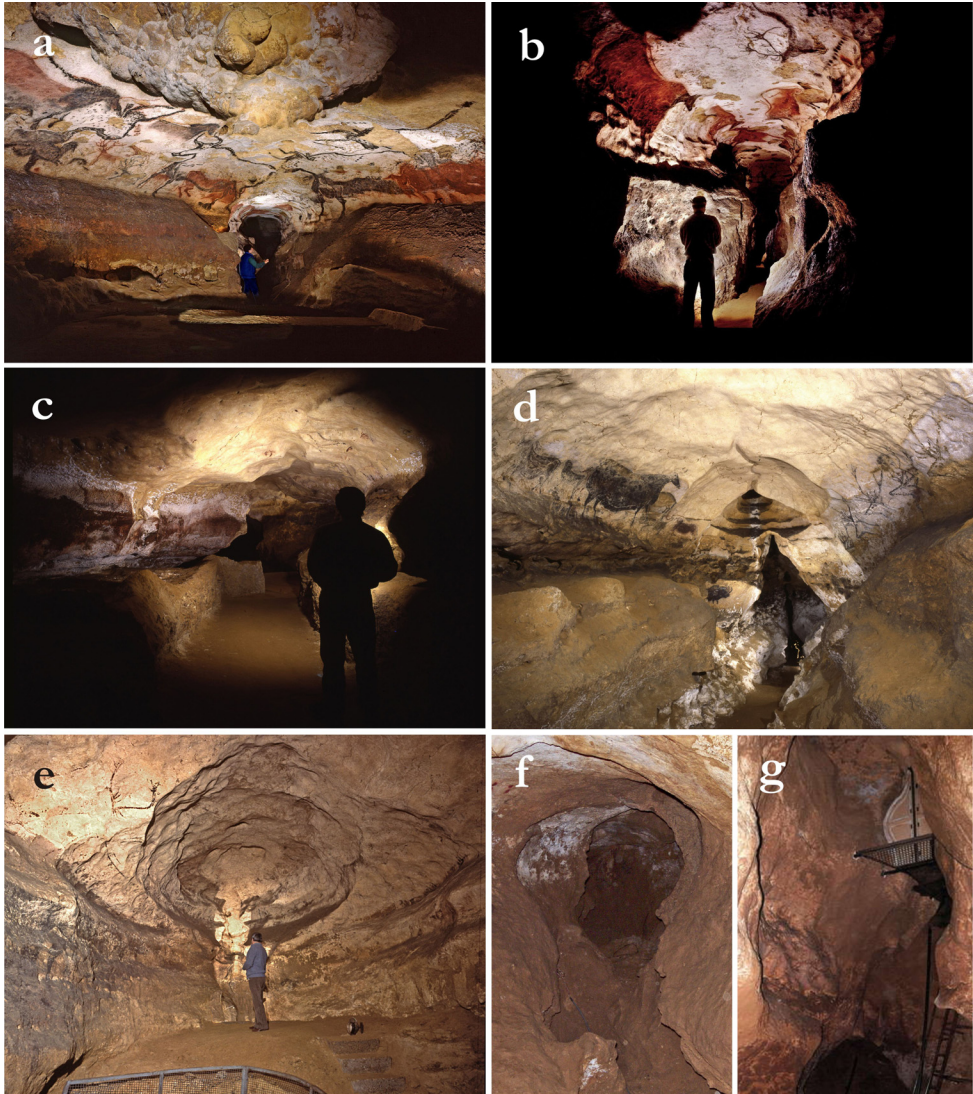


Figura 2. Sectores ornados de la cueva de Lascaux. **a.** Sala de los Toros. **b.** Divertículo Axial. **c.** Pasaje. **d.** Nave. **e.** Ábside. **f.** Cámara de los Felinos. **g.** Pozo. Fuentes:

<http://www.lascaux.culture.fr/>; <http://donsmaps.com/lascaux.html>

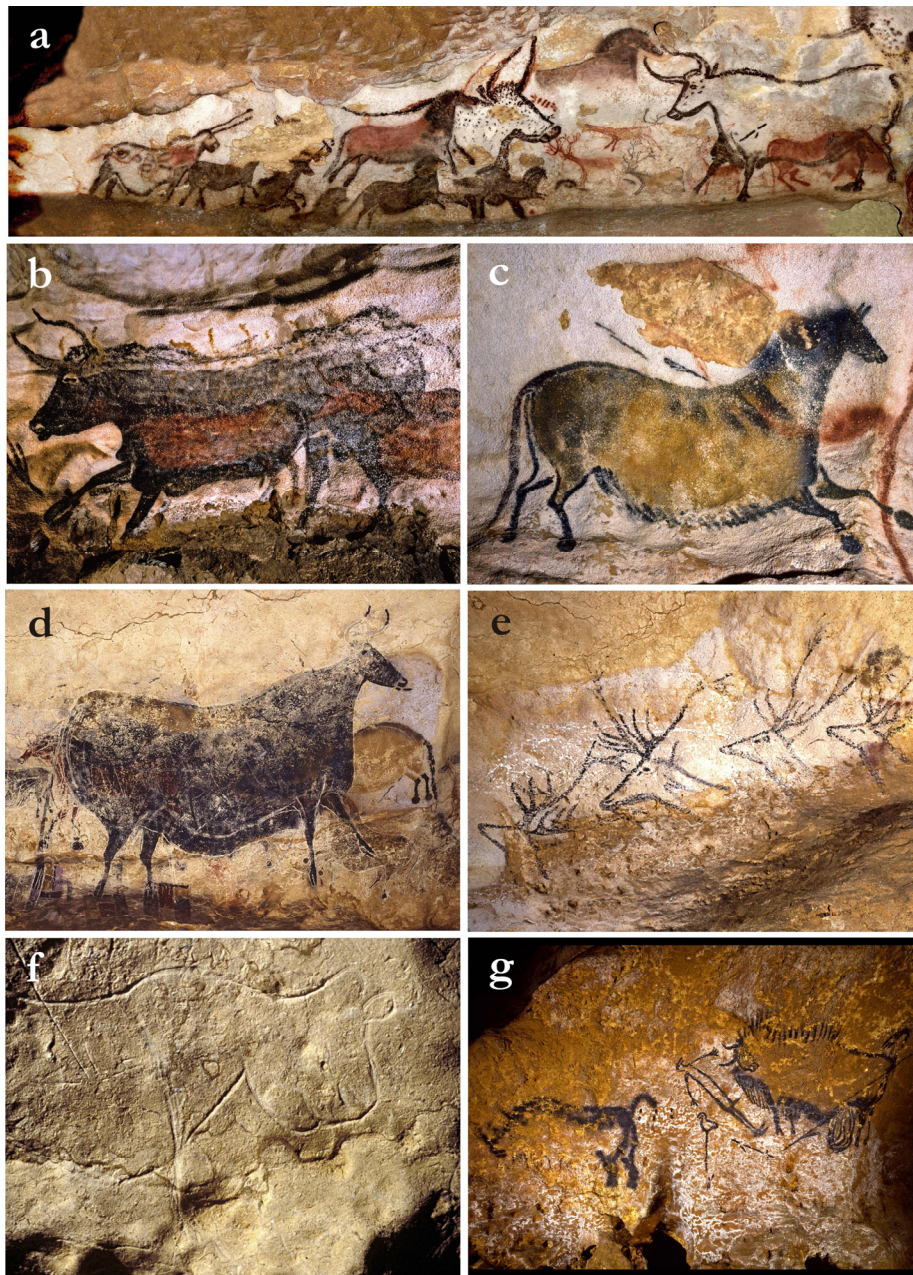


Figura 3. Figuras representativas de la cueva de Lascaux. **a.** Panel izquierdo de la Sala de los Toros. **b.** Gran Toro Negro (Divertículo Axial-izquierda). **c.** Tercer Caballo Chino (Divertículo Axial-derecha). **d.** Gran Vaca Negra (Nave-izquierda). **e.** Friso de los Ciervos Nadando (Nave-derecha). **f.** Felino (Cámara de los Felinos). **g.** Escena del Pozo. Fuente: <http://www.lascaux.culture.fr/>

El Divertículo de los Felinos tiene una longitud aproximada de 25 m, esta galería se estrecha considerablemente alcanzando una altura máxima de un metro en la Cámara de los Felinos (Fig. 2f). Más de 80 figuras han sido censadas en esta zona, el 90% de ellas se sitúan en los primeros metros del conducto, segmento más estrecho de este sector. Se distinguen 51 figuras animales (29 caballos, nueve bisontes, cuatro íbices, tres ciervos y seis felinos, que dan nombre a la sala; Fig. 3f) y abundantes símbolos.

El Ábside es un espacio de aproximadamente 30 m², su suelo está elevado respecto al nivel del Pasaje y de la Nave, y tiene una altura media de 3,5 m (Fig. 2e). Esta sala contiene más de mil figuras distribuidas sobre las paredes laterales y el techo en forma de cúpula, siendo principalmente grabados. Entre ellas, cerca de 500 representaciones de animales y 600 signos geométricos o trazos diversos. Tal exuberancia gráfica se explica en parte por su blando soporte calcáreo. Al fondo de esta sala se encuentra el acceso al Pozo, bajando una escalera metálica (Fig. 2g).

El Pozo sólo presenta ocho figuras, cuatro de ellas corresponden a animales (caballo, bisonte, pájaro y rinoceronte), otras tres son símbolos geométricos, y en la zona central aparece la única representación humana de la cueva. Exceptuando la figura del caballo situada en la pared derecha, el resto de figuras están agrupadas en unos 3 m² de la pared izquierda, constituyendo la llamada Escena del Pozo por su potencial narrativo difícil de interpretar (Fig. 3g).

La notoriedad de la cueva de Lascaux se basa esencialmente en las pinturas de la Sala de los Toros, Divertículo Axial y Nave (Fig. 3a-e). Sin embargo, por la elevada cantidad de figuras representadas en el Ábside, así como en el Pasaje, la Nave y el Divertículo de los Felinos, el arte de Lascaux está dominado por el grabado.

Revisión histórica de los principales acontecimientos e investigaciones

Descubrimiento y exposición al turismo

La cueva se descubrió el 12 septiembre de 1940 por cuatro jóvenes, Jacques Marsal, Georges Agniel, Simon Coëncas y Marcel Ravidat, tras inspeccionar una fisura en el terreno, pensando que podía tratarse del pasadizo secreto que conducía a la casa solariega de Lascaux, según narra una conocida leyenda local. Avisaron inmediatamente a su profesor Léon Laval, quien comunicó el hallazgo al prehistoriador Henri Breuil (Fig. 4a). Éste, un mes después, dirigió los primeros trabajos de registro fotográfico y dibujo de las figuras.

Pocos días después de su descubrimiento la cueva ya recibió una gran afluencia de visitantes. En diciembre de 1940 se clasificó con el título de Monumento Histórico con el acuerdo de su propietario, el Conde de la Rochefoucauld-Montbel.

Tras la Segunda Guerra Mundial, a partir de 1947, el propietario comenzó los trabajos de acondicionamiento de la cueva para hacerla accesible al público (Fig. 4b,e). La entrada de la cavidad fue objeto de importantes nivelaciones y se destruyeron los depósitos calcáreos que bloqueaban el acceso y amortiguaban los efectos del clima exterior sobre la atmósfera interna (Geneste 2006).

Se creó una monumental puerta de bronce, así como escaleras para descender hasta la Sala de los Toros; el nivel de los suelos se rebajó con el fin de construir un camino para las visitas y se instaló el alumbrado. El 13 julio de 1948 la cueva de Lascaux se abrió al público.

Las primeras excavaciones arqueológicas, realizadas por el abad Breuil y Séverin Blanc, comenzaron al año siguiente en la zona del Pozo. En 1952, el abad André Glory comenzó el registro de los numerosos grabados localizados en el Pasaje, Divertículo de los Felinos y principalmente en el Ábside (Fig. 4c). Estas tareas se prolongaron hasta 1963, identificando cerca

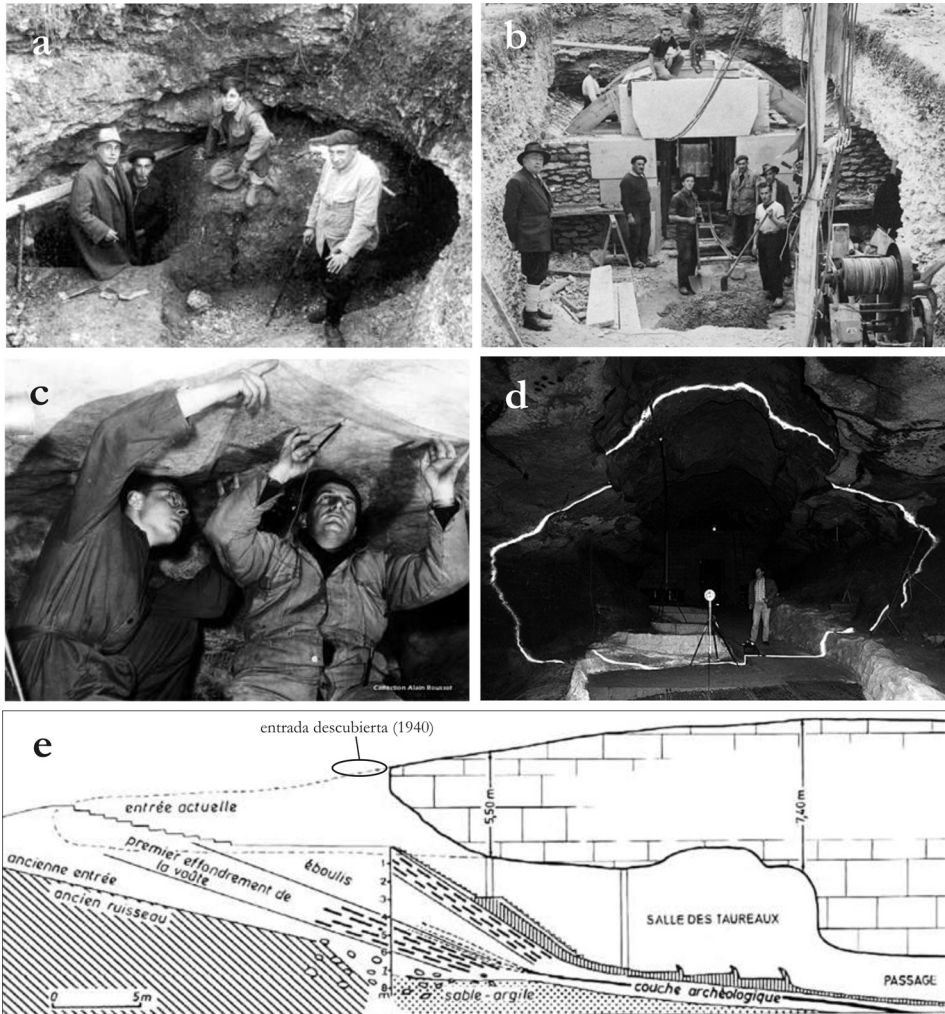


Figura 4. Acontecimientos históricos en la cueva de Lascaux. **a.** Entrada de la cueva descubierta en 1940, de izquierda a derecha: Léon Laval, Marcel Ravidat, Jacques Marsal y Henri Breuil. **b.** Obras en la entrada realizadas en 1948, a la izquierda aparece Léon Laval. **c.** Alain Roussot, a la izquierda, y André Glory, a la derecha, realizando un calco en 1953. **d.** Estudios de Norbert Aujoulat en la Sala de los Toros. **e.** Corte longitudinal de la entrada de la cueva, mostrando su evolución: en el Paleolítico (“ancienne entrée”), en su descubrimiento y tras las obras de 1948 (“entrée actuelle”); figura modificada de Glory y col. (2008). Fuentes: <http://www.lascaux.culture.fr/>; <http://donsmaps.com/lascaux.html>

de 1.500 figuras y produciendo alrededor de 120 m² de calcos (Glory y col. 2008).

Desde su apertura el número de visitantes aumentó rápidamente. En 1949 comenzaron a observarse algunos hongos negruzcos sobre las paredes, por ello, en 1950 se decidió acondicionar dos antecámaras previas a la Sala de los Toros (Geneste 2006).

Primera crisis bioclimática (1955-1970)

En 1955 la cueva ya acogía unos 30.000 visitantes al año. Durante los períodos de mayor afluencia se incrementaron los índices de dióxido de carbono, la condensación del agua sobre las paredes y la temperatura. Estos parámetros pusieron en riesgo la conservación de las obras parietales.

Ante la persistencia de estos fenómenos, a petición de la administración de los Monumentos Históricos, una potente máquina de regeneración de la atmósfera hubo de ser instalada en la cavidad. Los trabajos se realizaron entre diciembre de 1957 y abril de 1958. La parte vestibular de la cueva se excavó a cinco metros de profundidad para albergar el voluminoso equipamiento (Sala de Maquinas, Fig. 1b). El enterramiento de los conductos de extracción del aire condujo a socavar los suelos de los dos ejes principales de la cueva, desde la Sala de máquinas al fondo del Divertículo Axial, y desde la Sala de los Toros a la Galería del Moonmilk. El impacto de las obras fue brutal, se evacuaron 440 m³ (alrededor de 1.200 toneladas) de escombros, añadiéndose a los 32 m³ ya extraídos en la fase inicial de acondicionamiento en 1947-1948 (Geneste 2006). Estos trabajos destruyeron lo esencial de los niveles arqueológicos paleolíticos aún existentes en la cueva, los cuales no fueron objeto de ningún estudio organizado. Únicamente fueron supervisados por el Abad Glory que no disponía de ningún medio material ni humano para la intervención.

En 1960, Max Sarradet observó la aparición de manchas verdes sobre las paredes, asociadas a colonias de algas, este fenómeno fue conocido

como la enfermedad verde (“maladie verte”) y fue provocado por el incremento del CO₂ y la iluminación necesaria para las numerosas visitas. También se advirtió la formación acelerada de un velo de calcita sobre las paredes, debida a la condensación y al gran número de visitantes, este fenómeno fue conocido como la enfermedad blanca (“maladie blanche”) (Geneste 2006). En esta época también comenzaron a observarse colonizaciones bacterianas. En 1962, la afluencia de los visitantes siguió aumentando (100.000 visitantes al año, con picos en verano de hasta 1.800 al día), del mismo modo, la extensión de las manchas verdes se incrementó de un modo crítico, todo lo que llevó al propietario de la cueva a cerrar la cavidad al público en enero de 1963 y a solicitar el dictamen de expertos para intentar remediar las alteraciones constatadas. André Malraux, Ministro de Cultura, crea una Comisión Científica para estudiar los desequilibrios climáticos y microbiológicos, y cierra la cueva al público oficialmente el 18 de abril de 1963, situación que se mantiene en la actualidad.

El Dr. Jacques Pochon, miembro de la Comisión, ya había reconocido previamente una importante contaminación de bacterias, actinomicetos y muchos tipos de hongos en las paredes y aire de la cueva. Estos microorganismos podían tener una influencia indirecta sobre la proliferación de algas, por ello se decidió aplicar un tratamiento biocida previo al tratamiento específico contra las algas (Lefèvre 1974). Se realizaron pulverizaciones con una solución acuosa de antibióticos (penicilina, estreptomycin y kanamicina) por toda la cueva, los días 18-21 de julio de 1963 (Tabla 1). Los estudios realizados por Lefèvre (1974) confirmaron la elevada diversidad de organismos presentes en las rocas de la cueva: diferentes géneros de algas, bacterias, hongos, organismos ciliados y flagelados, amebas, rizópodos, rotíferos y nematodos. Identificó el agente causal de la enfermedad verde como el alga unicelular *Bracteacoccus minor*, y decidió los tratamientos específicos para combatirlo. Se realizaron pulverizaciones de una solución acuosa de formol por toda la cueva (suelo, roca desnuda e incluso sobre las pinturas afectadas; Tabla 1), compuesto

Tabla 1. Cronología de tratamientos biocidas aplicados en la cueva de Lascaux.

Fecha	Biocida	Aplicación	Objetivo
Julio 1963	Antibióticos en solución acuosa; penicilina, estreptomycin y kanamicina	Pulverización, toda la cueva	Reducción de bacterias, hongos y actinomicetos; previa al control de algas
1963	Formol en solución acuosa; diluciones según sustrato: 1:10-1:200	Pulverización, toda la cueva: roca (1:20), pinturas (1:200) suelo (1:10)	Manchas verdes de algas (<i>Bracteacoccus minor</i>)
1969	Formol en solución acuosa	Pulverización, zonas afectadas	Nuevas manchas verdes de algas
Julio 2001-Diciembre 2003	Vitalub QC50 (cloruro de benzalconio al 50%), solución al 5%	Pulverización, zonas afectadas	Colonizaciones blancas (<i>Fusarium solani</i>) Manchas negras
Octubre 2001-Diciembre 2005	Cal viva (1.360 Kg)	Cubrir suelos de toda la cueva y bancos laterales afectados(250 m ²)	Colonizaciones blancas (<i>Fusarium solani</i>)
Noviembre 2001-Julio 2002	Vitalub QC50 (cloruro de benzalconio al 50%), solución al 5%	Compresas embebidas, superficies afectadas	Colonizaciones blancas (<i>Fusarium solani</i>)
Diciembre 2001 (2 semanas)	Sulfato estreptomycin al 0,2% Sulfato polimixina al 0,15%	Pulverización, zonas afectadas	Colonizaciones bacterianas (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
Enero 2008	Devor Mousse (cloruro de benzalconio y cloruro de miristalconio 10-25%; 2-octil-2H-isotiazol-3-ona 2,5%), solución al 5%	Pulverización, Pasaje, Ábside y Nave	Manchas negras
Agosto 2008-Febrero 2009	Devor Mousse al 5%, Parnetol DF12 al 3% (isotiazolinonas)	Pulverización y aplicación con pincel, zonas A y C del Pasaje	Ensayo evaluación eficacia de tratamientos de manchas negras

que se seleccionó considerando que no daña los óxidos metálicos presentes en los pigmentos naturales de las pinturas (Lefèvre 1974). Estos tratamientos resultaron ser eficaces, eliminando las manchas verdes en cuatro meses, sin embargo, en 1969 tuvieron que reanudarse en algunas zonas para combatir nuevas colonizaciones verdes surgidas. También se recomendó la aplicación de este mismo biocida, como tratamiento preventivo, en las vías de entrada a la cueva y sobre el calzado de las visitas, lo cual se realizó hasta 1998 (Oriol y col. 2011).

En 1966 se desmontó el sistema de regeneración de aire y en 1967 se instaló un nuevo sistema de asistencia climática destinado a crear un punto frío artificial en la sala de máquinas con el fin de evitar la condensación y la consiguiente aparición de calcita sobre las paredes, tratando de reproducir la función que desempeñaban los depósitos naturales que colmataban la entrada de la cueva.

En 1969 la Comisión Científica establece un límite máximo de presencia humana en el interior de la cueva: cinco personas al día (un máximo de 35 minutos) cinco días a la semana. Esta medida se ha mantenido hasta la actualidad, exceptuando determinadas situaciones de emergencia (Geneste 2011).

Aparente normalización bioclimática (1970-2001)

Desde 1970 se han realizado controles periódicos de la contaminación microbiológica presente en el aire de la cueva, inicialmente llevados a cabo por el Instituto Pasteur de París y posteriormente por el Laboratorio de Investigaciones de Monumentos Historicos, del Ministerio de Cultura y Comunicación de Francia (LRMH). Los recuentos de hongos y bacterias totales, hasta el 2001, por lo general se mantuvieron en niveles relativamente bajos, representativos del equilibrio en este periodo (Oriol y Mertz 2006, Oriol y col. 2011). Se registraron niveles algo superiores en 1973, relacionados con los trabajos llevados a cabo para la construcción de la

réplica de la cueva, y a partir de 1994 los niveles se volvieron más inestables, coincidiendo con la aparición de una colonización fúngica en el suelo de la Sala de los Toros. En 1996 se observaron algunos líquenes (*sic*) de color gris verdoso en las paredes de la Sala de los Toros (Oriol y Mertz 2006).

En 1972, la sociedad civil “La Rochefoucauld” donó la cueva al Estado. En 1979 la cueva de Lascaux y otras situadas en el valle del río Vézère son declaradas Patrimonio de la Humanidad por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO).

En 1983 se abrió al público Lascaux II, una réplica de las dos principales salas ornadas (Sala de los Toros y Divertículo Axial), situada a 350 metros del original, aprovechando una antigua cantera parcialmente enterrada. Hoy en día, este lugar turístico acoge a más de 280.000 visitantes al año.

Entre 1988 y 1999, Norbert Aujoulat reanudó los estudios sobre el arte parietal presente en la cueva, incluyendo las figuras de la Sala de los Toros y del Divertículo Axial (Fig. 4d). La finalidad de estos trabajos fue la identificación de los factores que influyeron en las secuencias de construcción de las figuras y conjuntos iconográficos. Estas investigaciones revelaron, entre otras cosas, el papel fundamental de la arquitectura de la caverna en la distribución de las obras y las técnicas empleadas para su elaboración. Sus trabajos sobre la estacionalidad de los animales confirmaron la presencia de ciclos biológicos anuales vinculados a la realización de los distintos temas del bestiario. Se puso de manifiesto que la construcción de los paneles siguió un protocolo inmutable, en el transcurso del cual, el caballo fue siempre trazado en primer lugar, seguido del uro, y después del ciervo (Aujoulat 2004).

Segunda crisis biológica (2001-2006)

Entre 1999 y 2000 se sustituyó el sistema de asistencia climática instalado en 1967. El nuevo equipo se diseñó para realizar las mismas funciones, pero en la práctica resultó tener un peor resultado. La

contaminación fúngica, aparecida inmediatamente después de la instalación, condujo a suprimir el aislamiento térmico de gran parte de sus componentes, modificando su eficacia (Fig. 5a).

En julio de 2001, aparecieron colonizaciones de micelio fúngico blanco, inicialmente en la sala de entrada SAS2 y se dispersó rápidamente alcanzando los bancos laterales y paredes de la Sala de los Toros (Fig. 5b). El hongo responsable de este brote se identificó en septiembre de 2001 por el LRMH como *Fusarium solani*, muy frecuente en zonas agrícolas. Las masas de micelio se desarrollaron rápidamente en la cavidad e invadieron muy deprisa los suelos, bancos, paredes y bóvedas de la Sala de los Toros, Divertículo Axial, Pasaje y Nave. Por ello, el LRMH diseñó un plan de tratamientos biocidas muy agresivo como medida de urgencia (Oriol y Mertz 2006, Oriol y col. 2011) (Tabla 1).

Inicialmente, entre julio y septiembre de 2001, las zonas afectadas se pulverizaron con una solución al 5% del biocida Vitalub QC50 (cloruro de benzalconio al 50%), primero disuelto en etanol al 90% y después en agua. Estos tratamientos no consiguieron frenar el avance del brote, por ello, entre noviembre de 2001 y julio de 2002, se cubrieron las zonas afectadas con gasas embebidas en Vitalub QC50 al 5% (Fig. 5c). Adicionalmente, en octubre y noviembre de 2001, se aplicó cal viva a los suelos y bancos laterales de la cueva, aproximadamente unos 1.360 kg repartidos en unos 250 m² (Fig. 5d) (Sire 2006). El objetivo de aplicar este producto fue reducir la humedad y producir un efecto antifúngico por el “secado” de las hifas, para frenar la dispersión del brote rápidamente. Las pulverizaciones con Vitalub QC50 fueron una práctica habitual en los años sucesivos (2002 y 2003) en la lucha contra el brote de *F. solani*. Los suelos y bancos laterales permanecieron cubiertos de cal viva hasta diciembre de 2005.

El 22 agosto de 2002 se creó, por el Ministerio de Cultura y Comunicación de Francia, un Comité Científico para el estudio y conservación de la cueva, presidido por el inspector general de Arqueología Marc Gauthier.

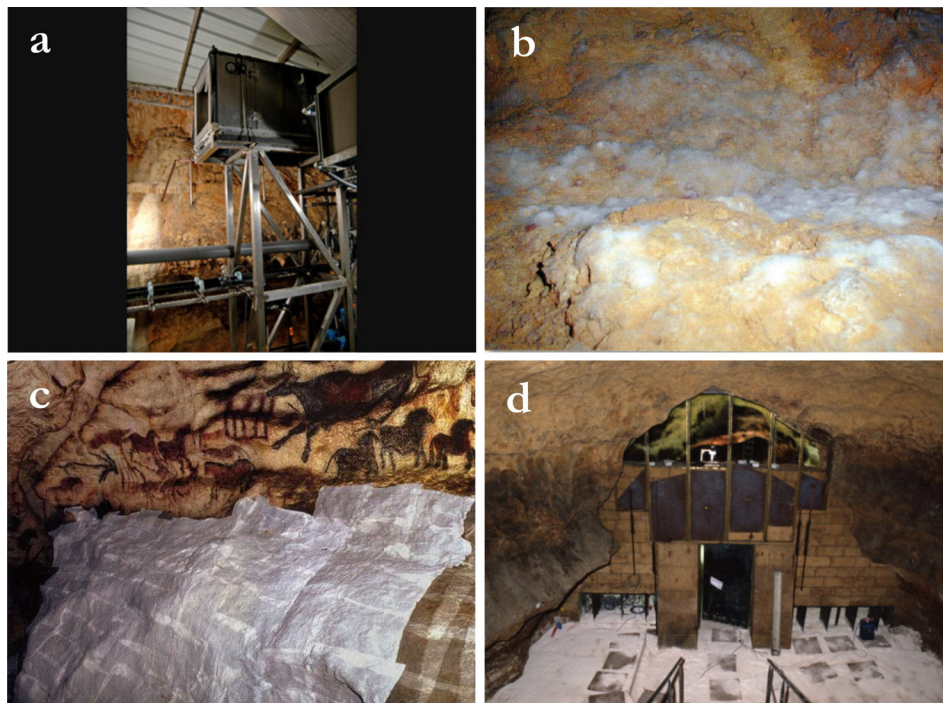


Figura 5. Crisis biológica causada por *Fusarium solani*. **a.** Sistema de asistencia climática instalado en el 2000, justo antes de la aparición del brote. **b.** Masas de micelio blanco cubriendo los bancos laterales en octubre de 2001. **c.** Tratamientos con gases embebidas en biocidas, aplicados entre noviembre de 2001 y julio de 2002, la imagen corresponde al Divertículo Axial-derecha. **d.** Esparcimiento de cal viva en los suelos y bancos laterales, en octubre y noviembre de 2001, la imagen corresponde a la sala SAS2. Fuente: <http://www.lascaux.culture.fr/>; Geneste (2008).

El hábitat de la cueva continuó claramente perturbado a lo largo del periodo de tratamientos, surgiendo nuevos problemas microbiológicos (Allemand 2003, Allemand y Bahn 2005, Graff 2006). Aparecen colonizaciones mucosas locales asociadas a la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, las cuales se trataron durante varias semanas con los antibióticos sulfato de estreptomicina al 0,2% y sulfato de polimixina al 0,15% (Oriol y Mertz 2006, Bastian y col. 2007). A partir de diciembre de 2001, cinco meses después del

inicio de los tratamientos, fueron apareciendo las primeras manchas negras localizadas en las paredes y techo de la Sala de Maquinas y de la sala SAS2 (Sire 2008), extendiéndose progresivamente, en tan sólo siete meses, a las bóvedas de la Sala de los Toros, Divertículo Axial, Ábside, Nave y Galería del Moonmilk. Las manifestaciones de este nuevo brote se trataron con los mismos biocidas (pulverizaciones de Vitalub QC50).

A partir de enero de 2004, se interrumpieron las aplicaciones con biocidas y se pasó a combatir las colonizaciones blancas y negras mediante limpieza mecánica utilizando esponjas, bisturí, y un equipo mecanizado (inyector-extractor; Gregomatic) (Fig. 6a,b)



Figura 6. Intervenciones realizadas en la cueva de Lascaux. **a, b.** Limpieza mecánica de las manchas negras: uso en octubre de 2003 del inyector-extractor Gregomatic en la bóveda de la Sala de los Toros (a), uso de esponjas en mayo de 2005 en la misma zona (b). **c.** Eliminación de la cal viva de los suelos del Ábside en 2006. **d.** Nuevos tratamientos biocidas aplicados en enero de 2008 contra las manchas negras de la Nave. Fuentes: Sire (2006, 2008).

En marzo de 2004, el Comité Científico organizó un plan global de conservación para gestionar las intervenciones e investigaciones necesarias en la cueva. En ese sentido, se establecieron una serie de acciones prioritarias:

(1) Modelización 3D del conjunto de la cavidad, que se llevó a cabo por el Gabinete Perazio en los años 2004-2005. Esta herramienta sirve hoy en día de base de geo-referencia para el conjunto de las observaciones realizadas en la cueva y ha permitido también precisar la situación exacta de la cavidad en la parcela que la alberga.

(2) Elaboración continúa de un acta del estado, registrando todos los datos sobre el estado de los suelos, bancos, paredes y bóvedas de la cavidad, disponiendo así de una herramienta útil que pueda servir de referencia a todas las observaciones posteriores. Esta labor se confió a un equipo de restauradores dirigidos por Patrick Jallet y Françoise Joseph, con la ayuda del geólogo François Rassinoux, y del fotógrafo Philippe Dubarry.

(3) Puesta en marcha de un simulador digital, para prever el impacto de cualquier tipo de perturbación vinculada con las circulaciones del aire, introducción de nuevos materiales o número de horas de presencia humana. Este dispositivo tiene por objetivo contribuir a definir el sistema de regulación de aire que necesita la cavidad, y modificar en consecuencia el dispositivo actual. Este programa de investigación se puso en marcha en junio de 2005 gracias a un convenio cuatripartito entre el Ministerio de Cultura y Comunicación, la Fundación EDF, el Centro Nacional de Investigación Científica (CNRS) y la Universidad de Burdeos.

(4) Estudio de las aguas de Lascaux, encargado al hidrogeólogo Roland Lastennet y al doctorando Benjamin López, del Centro de Desarrollo de Geociencias Aplicadas (CDGA) de la Universidad Burdeos. Se trataba de intentar comprender cómo se organizan las aguas de infiltración y condensación, y que papel han podido desempeñar en la difusión de los brotes de manchas blancas y negras.

(5) Programa de investigación Microbiología-Microclima, con el objeto de caracterizar las comunidades microbianas de la cueva de Lascaux y buscar las posibles correlaciones entre el desarrollo de los microorganismos y los parámetros físicos de la atmósfera y los sustratos. Este proyecto comenzó en el 2006 con la participación de los microbiólogos Claude Alabouvette y Fabiola Bastian, del Instituto Nacional de la Investigación Agronómica (INRA), Dijon, Francia; la especialista en climatología Adriana Bernardi, del Instituto de Ciencias Atmosféricas y Clima, Consejo Nacional de la Investigación (ISAC-CNR), Padua, Italia; y el LRMH.

(6) Extracción de la cal viva, que fue esparcida en 2001 sobre suelos y bancos laterales. Estas labores se llevaron a cabo entre diciembre de 2005 y octubre de 2006 (Fig. 6c).

(7) Continuación de las labores de seguimiento y limpieza mecánica de las manchas, según la intensidad del fenómeno y su localización (Fig. 6a,b).

Dupont y col. (2007) realizaron un estudio molecular de 36 cepas de *Fusarium*, aisladas principalmente en los años 2004 y 2005, de las colonizaciones blancas que cubrían los bancos de distintas salas de la cueva. Todas las cepas se identificaron como miembros del complejo de especies *F. solani*, el cual está compuesto por más de 45 especies distintas en sentido filogenético y/o biológico (Zhang y col. 2006). La caracterización molecular de las cepas, basada en el análisis PCR-RFLP del gen del Factor de Elongación 1 α (EF-1 α), sugiere que éstas pertenecen a tres especies filogenéticas distintas, todas ellas incluidas dentro del Clado 3 establecido por Zhang y col. (2006). Esta variabilidad genética encontrada en la cueva de Lascaux puede ser indicativa de que se han producido diferentes eventos de introducción a lo largo del tiempo. Las vías de entrada en la cueva pudieron ser diversas: desde los suelos situados encima de la cueva a través del agua o de pequeños animales, o desde el exterior por la elevada afluencia humana encargada de sustituir el equipo de asistencia climática justo antes de la aparición del brote (Dupont y col. 2007).

Adicionalmente, Dupont y col. (2007) también aisló de esas colonizaciones otros géneros fúngicos: *Chrysosporium*, *Gliocladium*, *Gliomastix*, *Paecilomyces*, *Trichoderma* y *Verticillium*.

Durante todo este periodo se continuaron realizando por el LRMH los controles periódicos de la contaminación microbiológica del aire de la cueva, aumentando considerablemente los puntos de control y la frecuencia de los análisis. Se observaron importantes fluctuaciones a lo largo de estos años de estudio, se detectó un aumento significativo de la polución aérea a finales de 2004 y comienzo de 2005. Respecto a los hongos, aumentaron fundamentalmente los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, debido a la abundante presencia humana para el control y mantenimiento (Oriol y Mertz 2006).

Del mismo modo, a lo largo de estos años, el LRMH realizó numerosos análisis microbiológicos de las distintas colonizaciones que iban apareciendo, para aislar e identificar los hongos asociados. La mayoría de las colonizaciones analizadas fueron de color blanco, y los aislamientos predominantes pertenecieron al género *Fusarium*. Sin embargo, frecuentemente se aislaron colonias de otros géneros: *Verticillium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Gliomastix*, *Gliocladium*, *Cladosporium* y *Alternaria* (Oriol y col. 2011).

Con el paso de los años, el brote de las colonizaciones blancas se redujo progresivamente hasta alcanzar una situación estable en los años 2005 y 2006. En estas fechas el brote estaba principalmente localizado en las salas: SAS1-C1, Pasaje, Ábside y Nave. En la actualidad aún persisten algunas colonizaciones en estas zonas, pero su evolución parece estar controlada.

Tercera crisis biológica (2006-Actualidad)

El brote de las manchas negras surgió a finales de 2001, tras los primeros tratamientos biocidas de urgencia. A partir de esta fecha, este tipo de colonizaciones fue progresando constantemente coexistiendo con las colonizaciones blancas, incluso apareciendo asociadas a ellas en muchas

zonas de la cueva. Sin embargo, fue a partir de 2006 cuando el brote de las manchas negras desarrolló un crecimiento explosivo, convirtiéndose en el principal problema que amenaza a la cueva de Lascaux. Para una mayor comprensión del fenómeno de las manchas negras, de su diversidad y evolución, conviene diferenciar la morfología y ubicación de las manchas. En función de la morfología que presentan las colonizaciones y el tipo de sustrato donde aparecen, se distinguen: manchas en paredes y bóvedas de roca caliza y manchas en paredes y bancos de sedimentos arcillosos. Esta clasificación fue propuesta por el equipo encargado del seguimiento y tratamiento de los brotes, dirigido por Alina Moskalik-Detalle (Comité Científico, 19 de noviembre de 2007).

Manchas negras en paredes y bóvedas de roca caliza

Primera etapa:

A ella corresponden las primeras manchas que aparecieron en la cueva a partir de diciembre de 2001. Éstas se extienden muy rápidamente, colonizando la mayoría de las bóvedas en sólo siete meses, siguiendo la siguiente dispersión: Sala de Máquinas, sala SAS2 (Fig. 7a), Sala de los Toros, Divertículo Axial, Ábside, Nave y Galería del Moonmilk, excluyendo el Pasaje.

Este tipo de manchas se localizan sobre la roca caliza desnuda. En las bóvedas recubiertas por calcita se restringen a las regiones donde la cubierta calcárea está rota. Algunas de estas colonizaciones aparecieron sobre pinturas de la Sala de los Toros, y sobre grabados del Ábside. Generalmente presentan dos morfologías: formadas por pequeños puntos negros incrustados en el sustrato, o bien, constituyendo un sombreado de color gris-negro con aspecto pulverulento y localización más superficial. Los análisis iniciales realizados por el LRMH, sobre algunas de estas manchas localizadas en la Sala de los Toros, las asociaron a los hongos *Gliomastix murorum* y *Cladosporium* sp. (Oriol y col. 2011).

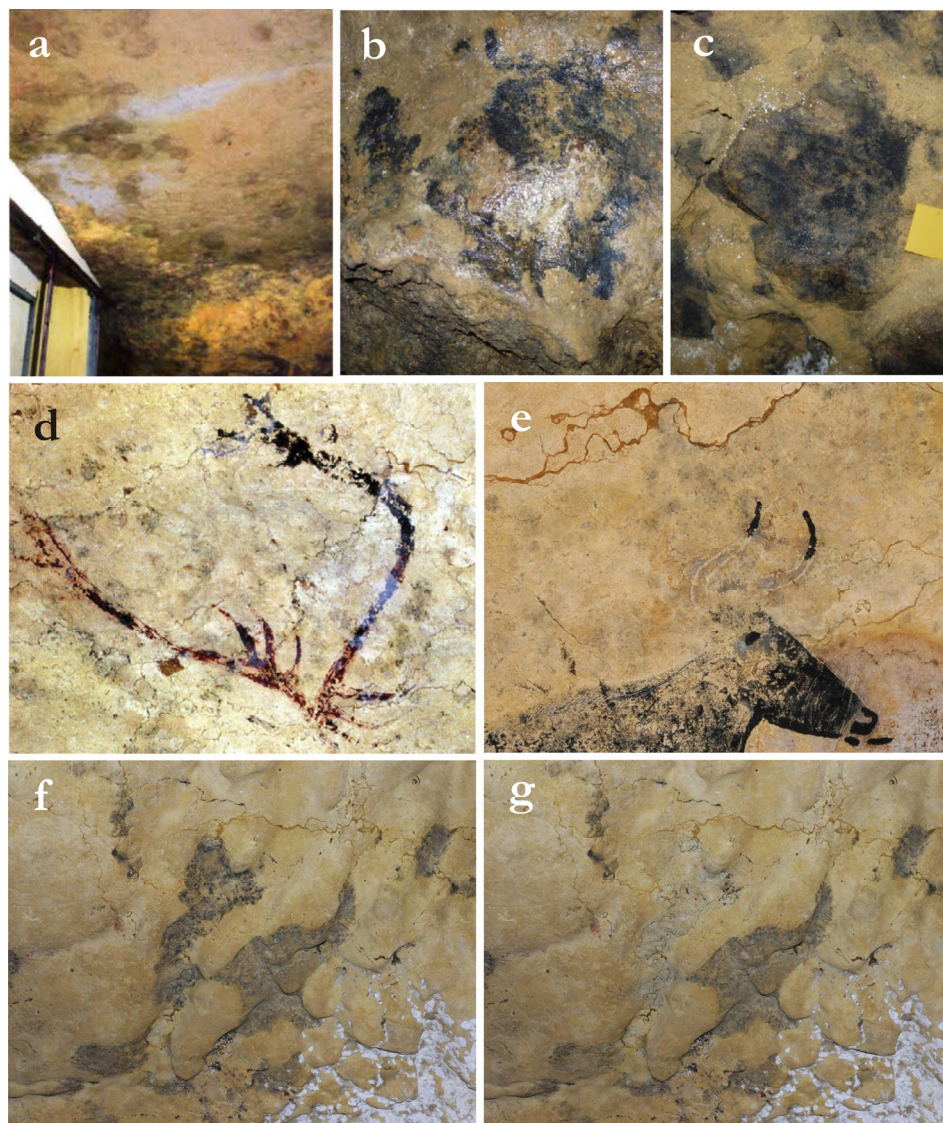


Figura 7. Brote de las manchas negras. **a.** Primeras manchas detectadas en la bóveda de la sala SAS2. **b, c.** Manchas sobre los bancos laterales arcillosos de la Sala de los Toros (b) y del Ábside (c), observadas en febrero de 2007. **d, e.** Manchas sobre la roca caliza afectando a las pinturas: cornamenta del Ciervo Abatido del Ábside (d), agosto de 2007; y cuernos de la Gran Vaca Negra de la Nave (e), marzo de 2008. **f, g.** Zona C del ensayo de eficiencia de tratamientos, antes de limpieza en julio de 2008 (f) y después de ella en octubre de 2008 (g). Fuentes: Geneste (2008), Sire (2008), Ministerio de Cultura y Comunicación de Francia.

Estas manchas se trataron inicialmente con el mismo biocida que se estaba aplicando a las colonizaciones blancas. A partir de enero de 2004, sólo se combatieron a través de protocolos de limpieza mecánica, siempre y cuando no se pusiera en riesgo la conservación de alguna figura artística.

Segunda etapa:

A partir de marzo de 2006, aparecieron de nuevo abundantes colonizaciones con características similares en las bóvedas del Pasaje, la Nave y el Ábside (Fig. 7d-f). Al igual que en la primera etapa, este tipo de manchas surgieron muy rápidamente aunque su evolución posterior fue bastante lenta. Sin embargo, en verano de 2007, se desarrollaron notablemente poniendo en riesgo la conservación de algunas pinturas y grabados. En este sentido, destacaron las colonizaciones cercanas a la cornamenta del Ciervo Abatido (Fig. 7d), a los cuernos de la Gran Vaca Negra (Fig. 7e), y al Friso de los Ciervos Nadando.

La aparición de estas manchas pudo estar relacionada con el aumento de la actividad humana en esas salas desde noviembre de 2005, debido a las labores de control, tratamientos y extracción de la cal viva. Por otro lado, en diciembre de 2006 se desmontó la puerta “SAS Bauer” situada entre la Sala de los Toros y el Pasaje, que desde el 1965 separaba los dos ejes principales de la cavidad. Esta actuación incrementó notablemente los niveles de condensación del agua en la cueva, lo cual pudo influir en el aumento posterior de las manchas negras.

Manchas negras en paredes y bancos de sedimentos arcillosos

Primera etapa:

Entre 2001 y 2004, aparecieron manchas negras en los bancos laterales de todas las salas de la cueva. Inicialmente, estas colonizaciones se interpretaron como micelios necrosados de las colonizaciones blancas tras los tratamientos químicos, pues frecuentemente los dos tipos de colonizaciones se encontraban asociados. Por ello, los tratamientos

efectuados fueron idénticos. También se observó una asociación de estas manchas negras con las zonas húmedas.

Como se ha mencionado, la mayoría de los aislamientos microbiológicos efectuados en esta época por el LRMH estuvieron centrados en las colonizaciones blancas, identificando principalmente hongos de los géneros *Fusarium* y *Penicillium*, y algunos *Cladosporium* y *Aspergillus*. Un análisis puntual realizado sobre una de las primeras manchas negras encontrada sobre un banco de la Sala de los Toros (13 noviembre de 2001), identificó en ella un hongo del género *Phialophora* (Dosier con información sobre la contaminación biológica de la cueva, LRMH, julio de 2002).

Segunda etapa:

A partir de 2004 aparecieron manchas negras independientes de las colonizaciones blancas en los bancos laterales de gran parte de la cueva. Estas colonizaciones se incrementaron progresivamente alcanzando en 2006 y 2007 una gran relevancia (Fig. 7b,c). El fenómeno más llamativo se produjo en el Pasaje, cuyos bancos sufrieron un ennegrecimiento progresivo cubriendo gran parte de su superficie.

Del mismo modo que las manchas de las bóvedas, el incremento observado en estas fechas pudo estar relacionado con el aumento de la actividad humana y el desmontaje de la puerta “SAS Bauer”. En este sentido, cabe destacar, que en salas con una afluencia mucho menor, Galería del Moonmilk y Cámara de los Felinos, las manchas que aparecieron sobre el sustrato arcilloso siguieron una evolución muy diferente, atenuándose en este periodo.

Una vez detallada esta clasificación, se continúa mencionando cronológicamente los principales acontecimientos e investigaciones:

La presencia de insectos cavernícolas en la cueva de Lascaux está directamente relacionada con los brotes fúngicos que se han sucedido. En enero de 2004 se detectaron insectos en el Divertículo Axial, bancos del Pasaje y suelo de la Galería del Moonmilk. Un año después, en junio de

2005, la población de insectos se incrementó notablemente, encontrándose ampliamente distribuidos por toda la cueva (Comité Científico, sesión de junio de 2005). La mayoría de individuos aparecieron en las manchas negras desarrolladas sobre el sustrato arcilloso (Fig. 8a,b), y se identificaron como la especie de colémbolos *Folsomia candida* (Bastian y col. 2010). Esta asociación con el fenómeno de las manchas negras explicaría el incremento observado en el 2005. Bastian y col. (2010) demostraron que *F. candida* se alimenta eficientemente del micelio de los hongos de la cueva de Lascaux, sus experimentos evaluaron dos especies aisladas de la cueva: *F. solani* (Fig. 8c), causante del brote de 2001, y *Scolecobasidium* sp. (Fig. 8d), frecuentemente aislado de manchas negras, como se detallará posteriormente. Este colémbolo puede actuar como vector de dispersión de los microorganismos, ya sea porque se quedan adheridos a su cuerpo, o bien, porque sus esporas sean digeridas y dispersadas en sus excrementos. Estos experimentos demostraron el importante papel de estas poblaciones en la dispersión de las manchas negras.

Los muestreos realizados en abril de 2006 y enero de 2007, por el INRA (Dijon, Francia), y su estudio posterior en colaboración con el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNAS-CSIC, Sevilla, España), se realizaron con el objeto de elaborar un completo inventario de hongos y bacterias presentes en la cueva de Lascaux, utilizando técnicas moleculares (Bastian y col. 2009a-c, Alabouvette y col. 2011). Se recogieron un total de 11 muestras procedentes de cuatro salas: Sala de los Toros, Divertículo Axial, Pozo y Cámara de los Felinos. Éstas representaron distintas situaciones frecuentes en la cueva: áreas húmedas y secas, sin colonizaciones evidentes, con colonizaciones blancas y/o negras, y áreas tratadas con biocidas. Para caracterizar sus comunidades microbianas, se construyeron genotecas en base al análisis de los distintos genes ribosomales: 18S para los hongos y 16S para las bacterias.

El estudio de las comunidades fúngicas (Bastian y col. 2009a), basado en el análisis de 607 clones, reveló que los 10 filotipos más abundantes representaban el 59% de los clones. Ocho de ellos correspondieron a

hongos entomófilos, identificados en función de la homología de sus secuencias 18S como: *Geosmithia namyslowskii*, *Geosmithia putterillii*, *Isaria farinosa*, *Aspergillus versicolor*, *Tolyposcladium cylindrosporum*, *Geomyces pannorum*, *Engyodontium album*, y Clavicipitaceae sp. Los otros dos se identificaron como hongos de suelo: *Tricholoma saponaceum* y *Kraurogymnocarpa trochleospora*. Sólo se encontraron siete clones correspondientes a *F. solani*, lo cual sugiere que la población de esta especie disminuyó drásticamente tras sucesivos años de tratamientos biocidas.

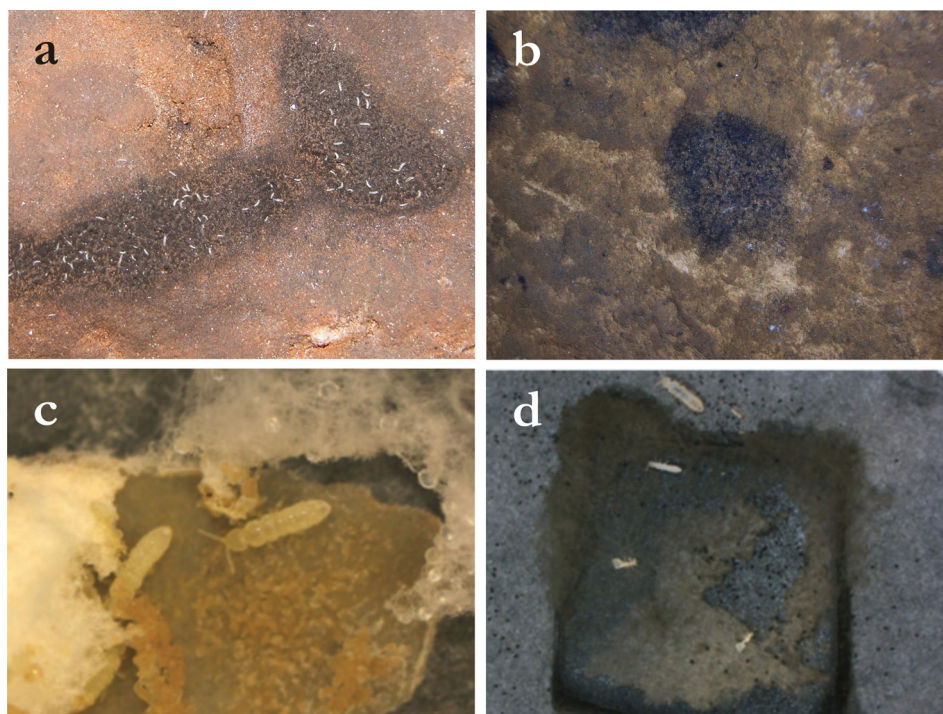


Figura 8. a, b. Manchas negras localizadas en el Ábside con abundantes colémbolos de la especie *F. candida*, observadas en 2005 (a) y en julio de 2008 (b). Fuente: Alina Moskalik-Detalle (Equipo de restauradores de la cueva de Lascaux). c, d. Ensayos para evaluar la apetencia de *F. candida* por los micelios de hongos aislados de la cueva de Lascaux: *F. solani* (c) y *Scoleobasidium* sp. (d). Fuente: Bastian y col. (2010).

El estudio de las comunidades bacterianas (Bastian y col. 2009b), basado en el análisis de 696 clones, reveló que los dos géneros más abundantes fueron *Ralstonia* y *Pseudomonas*, representando el 54% de los clones. Los filotipos más abundantes, identificados en función de la homología de sus secuencias 16S, fueron *Ralstonia mannitolilytica* y *Ralstonia pickettii*, cuya suma representó el 18% de los clones. Ambas especies han sido descritas como patógenos humanos (Daxboeck y col. 2005, Stelzmueller y col. 2006). Sólo se encontraron cinco clones de *P. fluorescens*, especie que se consideró responsable de las colonizaciones mucosas que aparecieron tras el comienzo de los tratamientos biocidas en 2001 (Oriol y Mertz 2006, Bastian y col. 2007). Según Bastian y col. (2009b), dos posibilidades pueden explicar la escasa representación de esta especie: que los tratamientos biocidas aplicados (sulfato de estreptomicina y sulfato de polimixina) resultaron efectivos eliminando en gran medida su población; o bien, que los aislamientos originales se identificaron mal y realmente correspondían a especies del género *Ralstonia*. La identificación bioquímica de las especies de *Ralstonia* utilizando test comerciales suele ser problemática y frecuentemente se confunden sus resultados con los de *P. fluorescens* (Daxboeck y col. 2005, Vanechoutte y col. 2001).

Otros filotipos bacterianos encontrados en este estudio correspondieron a los géneros *Afipia*, *Legionella*, y *Aquicella*, que están descritos como parásitos de amebas de vida libre. Estos resultados sugieren que este tipo de microorganismo debe ser relevante en la cueva de Lascaux. La abundante presencia de bacterias con potencial patogénico y protozoos pudo deberse a la selección ocasionada por el uso prolongado de biocidas (Bastian y col. 2009c).

El incremento global del fenómeno de las manchas negras producido a partir de 2006, y especialmente en el verano de 2007, ocasionó un gran debate mediático debido a la amenaza que suponían para el arte parietal, el desconocimiento del origen de la crisis y la mala gestión realizada en la cueva desde su descubrimiento (Simons 2007, De Roux 2007, Di Piazza 2007, Fox 2008, Bahn 2008, Geneste 2008, Sire 2008). Se puso de

manifiesto la polémica burocrática entre el Comité Internacional para la Conservación de Lascaux (ICPL), compuesto mayoritariamente por aficionados americanos al arte rupestre, y los organismos encargados de la gestión y conservación de la cueva (Ministerio de Cultura y Comunicación de Francia) (Di Piazza 2007, Fox 2008).

En agosto de 2007, los grupos de investigación del LRMH y del INRA, con el objeto de identificar los hongos responsables de la formación de las manchas negras, realizaron en paralelo aislamientos en medios de cultivo e identificación de las cepas más abundantes. En estos muestreos se analizaron las manchas que colonizaban las bóvedas de caliza del Pasaje y del Ábside, gran parte de las muestras se recogieron de los alrededores de la cornamenta del Ciervo Abatido (Ábside, Fig. 7d). El LRMH identificó, utilizando criterios morfológicos, dos géneros mayoritarios: *Ulocladium*, que desarrollaba colonias melanizadas y por ello se consideró el principal responsable de estas manchas, y *Gliocladium*, que por el contrario formaba colonias de color blanco (Oriol y col. 2011). El personal del INRA obtuvo resultados similares, encontrando abundantes colonias de un hongo dematiáceo de color verde oliva-negro, semejantes al *Ulocladium* descrito por el LRMH. Sin embargo, las características microscópicas de sus conidios no coincidían con las descritas para el género *Ulocladium*, y el análisis molecular del gen ribosómico 18S aproximó su identificación al género *Scolecobasidium* (Bastian y Alabouvette 2009d). Posteriormente, el análisis de los espaciadores internos transcritos del ADN ribosómico (regiones ITS), determinó que el homólogo más cercano correspondía a la especie *S. tsbanytschae* (Bastian y col. 2010). Ésta y otras especies del género *Scolecobasidium*, con conidios elipsoidales, claviformes o fusiformes, fueron anteriormente ubicadas en el género *Ochroconis*, mientras que el género *Scolecobasidium* se quedó restringido a las especies con conidios trilobulados (de Hoog y von Arx 1973). Por lo tanto, la identificación del principal hongo asociado a las manchas negras aun sigue siendo confusa.

En enero de 2008, teniendo en cuenta la situación crítica que alcanzó en fenómeno de las manchas negras, se aplicó un nuevo tratamiento biocida

en las bóvedas del Pasaje, Ábside y Nave. El producto biocida seleccionado por el LRMH, en base a los ensayos de eficacia frente a las cepas de *Ulocladium* (*sic*) y *Gliocladium*, fue una solución acuosa de Devor Mousse al 5% [mezcla de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio 10-25%; cloruro de miristalconio 10-25%) y 2-octil-2H-isotiazol-3-ona 2,5%] (Tabla 1). Se realizaron tres pulverizaciones en días sucesivos y la cueva permaneció cerrada durante los tres meses siguientes. Antes y después de los tratamientos se analizaron por el LRMH diversos parámetros de control en diferentes zonas tratadas. Según estos análisis, los tratamientos biocidas redujeron los siguientes parámetros: polución aérea, actividad metabólica y viabilidad de los hongos presentes (Sire 2008, Orial y col. 2011). Sin embargo, a los pocos meses se comprobó que los tratamientos aplicados resultaron ineficaces para controlar las manchas negras (Lichfield 2008).

En julio de 2008, la UNESCO, considerando los informes remitidos por el ICPL en septiembre de 2007 y febrero de 2008, amenazó a los organismos encargados de la gestión y conservación de la cueva, pertenecientes al Gobierno de Francia, con incluir la cueva de Lascaux en el listado de Patrimonio Mundial en Peligro, a no ser que se llevaran a cabo las medidas oportunas para garantizar su conservación (Lichfield 2008, Butler 2010). Actualmente, la cueva sigue siendo considerada Patrimonio de la Humanidad, y el Gobierno de Francia informa periódicamente a la UNESCO de su estado y de las actuaciones que se llevan a cabo para su conservación.

Con los últimos tratamientos biocidas se reabrió el debate sobre la eficacia de éstos y el riesgo que conllevan para los ecosistemas de la cueva. Entre agosto de 2008 y febrero de 2009, se realizó un ensayo para evaluar la eficacia de los distintos tratamientos de control: aplicación de biocidas y/o protocolos de limpieza mecánica. Para ello, se seleccionaron cuatro zonas colonizadas con manchas negras en las paredes de roca caliza del Pasaje. En cada una de ellas se aplicó una combinación distinta de tratamientos: limpieza superficial y biocida (A), limpieza superficial sin biocida (B), limpieza profunda y biocida (C), y limpieza profunda sin biocidas (D). En

las zonas A y C se aplicaron tres pulverizaciones de Devor Mousse al 5% y una aplicación adicional de Parmetol DF12 al 3% (isotiazolinonas) (Tabla 1). Según los análisis del LRMH (Oriol y col. 2011), inicialmente se aislaron abundantes colonias de los géneros *Ulocladium* y *Curvularia*, y con menor frecuencia *Verticillium* y *Penicillium*. Los biocidas empleados redujeron notablemente la actividad metabólica y la viabilidad de los hongos, ya que no se consiguió aislar ningún hongo de las zonas tratadas con biocidas.

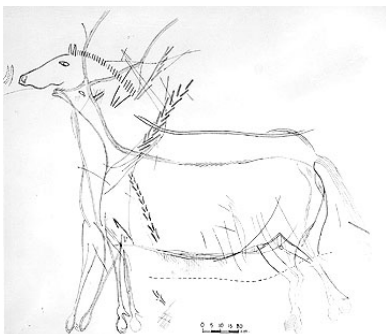
En mayo de 2009, el Comité Científico aprobó el proyecto de investigación titulado “Ecología microbiana de la cueva de Lascaux”, en el que participaban los institutos: IRNAS-CSIC (Sevilla) e INRA (Dijon). Los objetivos planteados para este proyecto fueron los siguientes: (1) caracterizar los hongos metabólicamente activos de la cueva de Lascaux, (2) determinar la naturaleza bioquímica de las manchas negras, (3) determinar la ecología y las fuentes metabólicas de las especies de *Scolecobasidium* y otros hongos melanizados presentes en las paredes, y (4) determinar el nivel de contaminación del aire de la cueva. En el marco de este proyecto de investigación se realizaron los trabajos que componen la presente Tesis Doctoral.

Objetivos planteados

La finalidad de esta Tesis Doctoral fue profundizar en el estudio del brote de las manchas negras, que actualmente representa la principal amenaza para el patrimonio artístico de la cueva de Lascaux. Con este estudio se pretendía: identificar las comunidades fúngicas implicadas en la formación de las manchas negras y establecer el papel que juegan; conocer los factores que ocasionaron el brote, y aquellos que influyen en su evolución.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos:

- 1- Identificar las especies de los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium* aisladas de las manchas negras de la cueva de Lascaux, y caracterizar sus fuentes nutricionales.
- 2- Conocer la distribución en la cueva de las especies de los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium*, y su asociación con el fenómeno de las manchas negras.
- 3- Estudiar las comunidades fúngicas asociadas a las manchas negras, prestando especial atención a los hongos que se encuentran metabólicamente activos en la actualidad.
- 4- Caracterizar la morfología y composición química de las manchas negras, conocer el papel que juega la melanina de *Ochroconis* y *Scolecobasidium* en su formación, y el posible papel de otros hongos.



CAPÍTULO 2

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE *OCHROCONIS-SCOLECOBASIDIUM*

Con el fin de concretar la identificación de aquellas cepas de *Ochroconis-Scolecobasidium* que se aislaron de la cueva de Lascaux, se llevaron a cabo distintos estudios a nivel molecular y morfológico. Posteriormente, se caracterizaron algunos aspectos fisiológicos relevantes de las especies identificadas, como el perfil de ácidos grasos, la tolerancia al cloruro de benزالconio, y las fuentes nutricionales.

Introducción a los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium*

El género *Scolecobasidium* fue descrito por primera vez por Abbott (1927), incluyendo las especies *S. terreum* (especie tipo) y *S. constrictum*, ambas aisladas de suelos de cultivos de algodón y caña de azúcar. Desde entonces un total de 44 especies han sido descritas para este género. Barron y Busch (1962) describieron las especies *S. humicola* y *S. variabile*, también aisladas de muestras de suelos. Roy y col. (1962) describieron *S. verruculosum* y *S. macrosporum*, aisladas de pastizales. Graniti (1963) describió *S. anellii* como la especie causante de manchas negras que recubrían las estalactitas de la cueva de Castellana, Bari, Italia.

El género *Ochroconis* fue establecido por de Hoog y Arx (1973) incluyendo aquellas especies de *Scolecobasidium* con conidios elipsoidales, claviformes o fusiformes (la mayoría de las especies descritas), mientras que el género *Scolecobasidium* quedó reducido a las especies con conidios trilobulados (entre ellas *S. terreum*). McGinnis y Ajello (1974, 1975) describieron la nueva especie *S. tshanytschae*, incluyendo la cepa tipo de *Heterosporium tshanytschae*, aislada por Doty y Slater (1946) de salmón, y sus sinónimos *S. variabile* y *S. macrosporum*. Kirilenko y Al-Akhmed (1977) reclasificó esta especie dentro del género *Ochroconis*, describiendo la nueva combinación *O. tshanytschae*.

Los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium* se aíslan frecuentemente de suelos y restos vegetales (Abbott 1927, Barron y Busch 1962, Roy y col. 1962, Grandi y Gusmão 2002). Algunas especies han sido aisladas de otros ambientes, como aire (Lugauskas y col. 2003, Nováková 2009), plantas acuáticas (Orłowska y col. 2004.), alimentos (Comerio y col. 2005), y lavadoras y baños (Hamada 2005a,b; Hamada y Abe 2008). *Scolecobasidium constrictum* fue descrito como hongo parásito de diversos nematodos (Upadhyay 1966, Trifonova y Karadjova 2003).

Las especies *O. humicola* y *O. tshanytschae* han sido descritas en diversas ocasiones como agente causal de infecciones sistémicas, principalmente en peces (Doty y Slater 1946, Ajello y col. 1977). *O. humicola* también ha sido

detectada en tortuga (Weitzman y col. 1985) y gato (VanSteenhouse y col. 1988), y *O. tshanytschae* ha sido descrita recientemente como patógeno humano causando feohifomicosis subcutánea (Ge y col. 2012). *Ochroconis gallopava* causa enfermedades importantes en los seres humanos (de Hoog y col. 2000), asociada a diversas patologías, tales como feohifomicosis subcutánea, endocarditis, feohifomicosis cerebral, principalmente en pacientes inmunodeprimidos (Horré y de Hoog 1999).

Material y métodos

Identificación molecular de especies de *Ochroconis-Scolecobasidium*

Cepas estudiadas

Se estudiaron un total de 30 cepas de *Ochroconis-Scolecobasidium* de la cueva de Lascaux (Fig. 9, Tabla 2), en su mayoría aisladas en años anteriores a este estudio (2007-2009) por el INRA de Dijon, Francia. La mayor parte de éstas proceden de las manchas negras que aparecieron sobre las paredes y bóvedas de caliza del Ábside (cornamenta del Ciervo Abatido, agosto de 2007) y del Pasaje (zonas A-D utilizadas en el ensayo de evaluación de los tratamientos de control, agosto de 2008-febrero de 2009). Sin embargo, el INRA también aisló algunas cepas de manchas desarrolladas sobre los sedimentos arcillosos de la Sala de los Toros (LX CH24), Divertículo Axial (LX CH40 y LX CH50) y Pasaje (LX 7.2). Adicionalmente, se incluyó para su comparación e identificación, una cepa (LX PDA) aislada de la cueva, en localización desconocida, e identificada como *Ulocladium* sp. por el LRMH.

Además, se incluyeron siete cepas aisladas de manchas desarrolladas sobre los bancos arcillosos y de muestras de aire recogidas en este estudio (2010-2011); las características de estas muestras y la metodología para los aislamientos se detallan en los capítulos 3 y 4 respectivamente. Para realizar las comparaciones oportunas que nos permitieran identificar las cepas de la cueva, se incluyeron cinco cepas de referencia (Tabla 3), procedentes de la

colección internacional de hongos del “Centraalbureau voor Schimmelcultures” (CBS), Utrecht, Holanda.

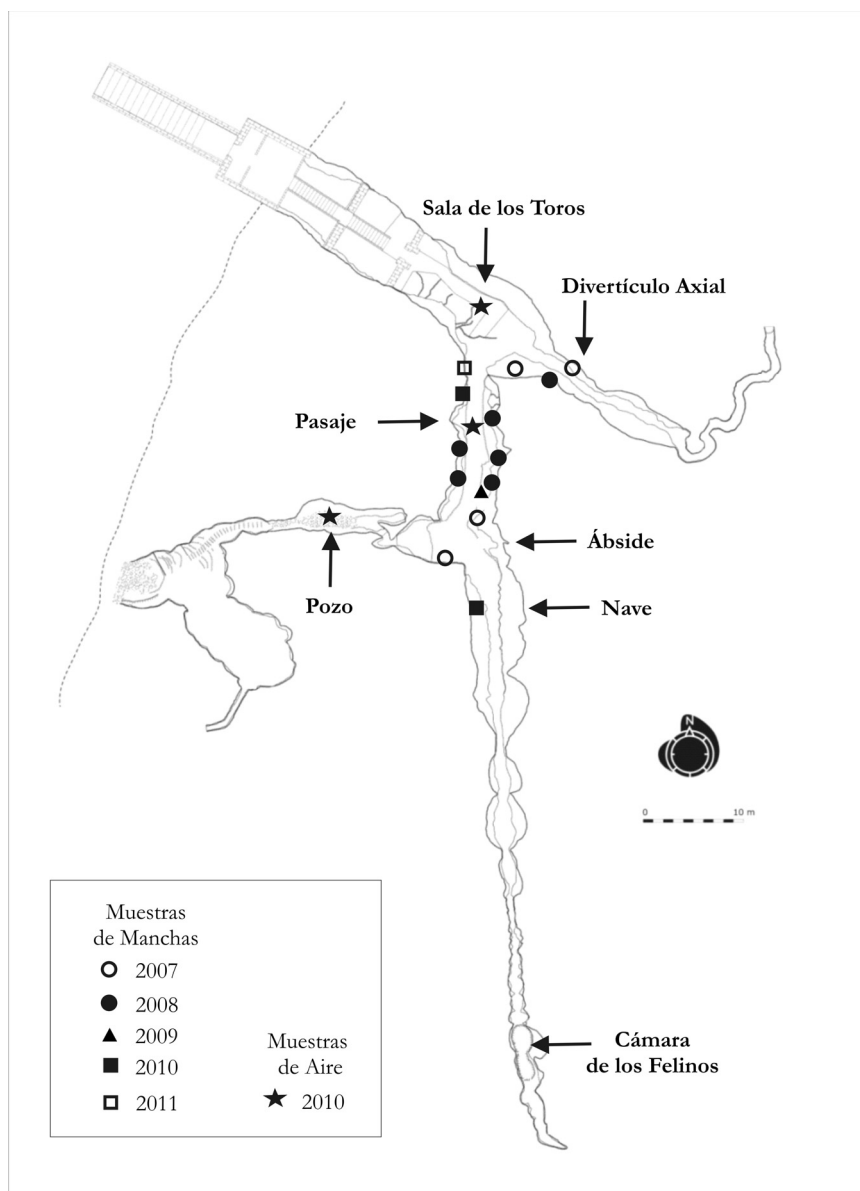


Figura 9. Mapa de la cueva de Lascaux localizando los puntos de muestreo donde se aislaron las cepas de *Ochroconis-Scolecobasidium* incluidas en este estudio, se detalla el tipo de muestra analizada y la fecha de recolección.

Tabla 2. Cepas de *Ochroconis-Scolecobasidium*, procedentes de la cueva de Lascaux, utilizadas en este estudio.

Cepas	CMFISB ^a	Muestra, sustrato	Localización	Fecha
LX CH2 ^g	1859	Mancha gris, caliza	Ábside Superior-izquierda	23/08/2007
LX CH3 ^{dg}	1860	Mancha gris, caliza	Ábside Superior-izquierda	23/08/2007
LX CH7 ^{deg}	1861	Mancha gris, caliza	Ábside Superior-izquierda	23/08/2007
LX CH8		Mancha gris, caliza	Ábside Superior-izquierda	23/08/2007
LX CH9		Mancha gris, caliza	Ábside Superior-izquierda	23/08/2007
LX CH13	1943	Puntos negros, caliza	Pasaje-izquierda	23/08/2007
LX CH15		Puntos negros, caliza	Pasaje-izquierda	23/08/2007
LX CH16 ^{cdfg}	2031	Mancha negra, caliza	Pasaje-izquierda	23/08/2007
LX CH24		Mancha negra, arcilla	Sala de los Toros-derecha	23/08/2007
LX CH40 ^{cdeg}	1866	Colonia fúngica, arcilla	Divertículo Axial-derecha	23/08/2007
LX PDA ^b		Desconocida	Desconocida	2008
LX 7.2 ^{deg}		Mancha negra-rosa, arcilla	Pasaje-derecha	09/04/2008
LX CH50		Mancha negra, arcilla	Divertículo Axial-derecha	09/07/2008
LX A1 ^{cdeg}	1862	Mancha negra, caliza	Pasaje-izquierda	26/08/2008
LX A3 ^{dg}	1863	Mancha negra, caliza	Pasaje-izquierda	26/08/2008
LX B1		Mancha negra, caliza	Pasaje-izquierda	26/08/2008
LX B2		Mancha negra, caliza	Pasaje-izquierda	26/08/2008
LX B4		Mancha negra, caliza	Pasaje-izquierda	26/08/2008
LX C1		Mancha negra, caliza	Pasaje-izquierda	26/08/2008
LX D1		Mancha negra, caliza	Pasaje-derecha	26/08/2008
LX CC3		Mancha negra, caliza	Pasaje-izquierda	07/10/2008
LX DDD1		Mancha negra, caliza	Pasaje-derecha	05/11/2008
LX CCCC2		Mancha negra, caliza	Pasaje-izquierda	12/02/2009
LX 7G-2		Aire	Pozo	16/02/2010
LX 21T-2		Aire	Pasaje	16/02/2010
LX 40LL-6		Aire	Sala de los Toros	16/02/2010
LX 101R-6 ^{deg}	1865	Mancha negra, arcilla	Pasaje-derecha	17/02/2010
LX 101R-7	2033	Mancha negra, arcilla	Pasaje-derecha	17/02/2010
LX 107X-8		Mancha verde-amarillo, arcilla	Nave-derecha	17/02/2010
LX M1-3	2083	Mancha negra, arcilla	Pasaje-derecha	01/02/2011

Tabla 2 (Continuación).

^a: CMF ISB: Colección de Hongos Microscópicos, Instituto de Biología del Suelo, Academia de Ciencias, Ceské Budejovice, República Checa. Se depositaron las cepas estudiadas en la identificación morfológica y descripción taxonómica de las nuevas especies.

^b: La cepa LX PDA se aisló e identificó previamente como *Ulocladium* sp. por el LRMH, Francia.

^c: Cepas estudiadas para caracterizar la tasa de crecimiento a distintas temperaturas y la tolerancia al cloruro de benzalconio.

^d: Cepas estudiadas en la caracterización del perfil de ácidos grasos.

^e: Cepas estudiadas en la caracterización de las fuentes de carbono (Sistema Biolog).

^f: La cepa LX CH16 se utilizó para evaluar el cloruro de benzalconio y los productos de su degradación como fuentes nutricionales.

^g: Cepas estudiadas en la caracterización de las enzimas degradativas (Sistema API ZYM).

Tabla 3. Cepas de referencia de *Ochroconis-Scolecobasidium* procedentes de la colección de hongos del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).

Cepas (CBS)	Identificación	Muestra	Origen	Especie tipo (referencia)
100438	<i>O. tshanytschae</i>	Pez (salmón)	Desconocido	Tipo <i>Heterosporium tshanytschae</i> (Doty y Slater 1946).
284.64	<i>O. anellii</i>	Estalactita ennegrecida	Cueva de Castellana, Bari, Italia	Tipo <i>S. anellii</i> (Graniti 1963)
211.53	<i>O. constricta</i>	Suelo	Ancastar, Ontario, Canada	Tipo <i>Heterosporium terrestre</i> (Atkinson 1952)
116655	<i>O. humicola</i>	Turba	Guelph, Ontario, Canada	Tipo <i>S. humicola</i> (Barron y Busch 1962)
536.69	<i>S. terreum</i>	Suelo de bosque	Ontario, Canada	Aislado e identificado por G.L. Barron en 1962

Se seleccionaron las cuatro especies de los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium* más relevantes en cuanto a su distribución e impacto en la

bibliografía, *O. tschanytschae*, *O. constricta*, *O. humicola* y *S. terreum*. Se descartó la especie *O. gallopava* por su potencial patogénico en humanos, tras verificar su lejanía filogenética del resto. Adicionalmente, se seleccionó la especie *O. anellii* por estar descrita en cuevas causando manchas negras en estalactitas (Graniti 1963). Cuatro de las cepas de referencia corresponden a las cepas tipo, exceptuando *S. terreum* CBS 536.69, la cual se seleccionó tras comprobar que la cepa tipo CBS 203.27 conservada en colección estaba mal identificada, como confirman los estudios realizados por Horré y col. (1999).

Para su conservación, todas las cepas se cultivaron en tubos con medio MEA (extracto de malta 20 g/l, agar 20 g/l) inclinado, y se incubaron a 25°C en oscuridad hasta completar su crecimiento. Posteriormente, los cultivos se conservaron en colección a 5°C hasta su uso.

Extracción de ADN genómico de cepas fúngicas

Todas las cepas detalladas en las Tablas 2 y 3 se incluyeron en el análisis molecular. La extracción de ADN se realizó a partir del micelio de las colonias crecidas durante un mes a 25°C en oscuridad sobre placas de MEA. Un centímetro cuadrado de micelio se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml que contenía 500 µl del tampón de extracción TNE (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM; pH 8) y perlas de vidrio de 2 y 4 mm de diámetro. La mezcla se homogenizó utilizando un equipo Fast-Prep 24 (MP Biomedicals), aplicando dos ciclos de 45 segundos a una velocidad de 4,5 m/s. Se eliminaron las proteínas añadiendo 50 µl de dodecilsulfato sódico (10% p/v) y 70 µl de proteinasa K (10 mg/ml), y para ello, se incubó la mezcla a 50°C durante una hora. El ADN se purificó con 750 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla se centrifugó a 8.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se sometió a una purificación adicional con 450 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se repitió la centrifugación en idénticas condiciones y se recogió el sobrenadante. La precipitación del ADN se realizó añadiendo 50

μl de acetato de sodio (3M) y 1 ml de etanol absoluto. Para estimular la precipitación se incubó la mezcla a -20°C durante 30 minutos y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se lavó con etanol (70%) y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN precipitado se disolvió en 100 μl de agua ultra pura estéril y se cuantificó la concentración resultante utilizando un equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de la extracción se conservaron a -80°C hasta su uso.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron dos marcadores para la caracterización molecular de las cepas. En primer lugar, las regiones del ADN ribosómico que corresponden a los espaciadores internos transcritos 1 y 2 (ITS1 e ITS2). Estas son regiones no codificantes situadas entre los genes ribosómicos 18S y 5.8S (ITS1), y entre 5.8S y 28S (ITS2), por ello son zonas muy variables que acumulan mutaciones y resultan especialmente útiles para diferenciar especies dentro de un mismo género. Se utilizaron los cebadores universales ITS1 (5'-TCC GTA GGT CCT GAA GCG G-3 ') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') descritos por White y col. (1990), que amplifican en eucariotas la región ITS1-5.8S-ITS2 de longitud variable según el organismo, generalmente comprendida entre los 400 y 900 pares de bases (pb). El segundo marcador utilizado fue una región del gen de la enzima ARN polimerasa II subunidad B (RPB2), la cual también ha sido ampliamente utilizada en estudios filogenéticos de ascomicetos. Generalmente, este marcador suele emplearse para comparar niveles taxonómicos superiores: orden, familia y género. Sin embargo, también ha demostrado su variabilidad entre distintas especies del género *Scolecobasidium* (dela Cruz 2006a). Se utilizaron los cebadores específicos de hongos fRPB2-5F (5'-GAY MGW GAT CAY TTY GG-3 ') y fRPB2-7CR (5'-CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT-3') descritos por Liu y col. (1999), que amplifican una región codificante de aproximadamente unos 1.100 pb.

Cada reacción de PCR se desarrolló en un volumen final de 50 µl. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5 µl de tampón de reacción 10X [Tris-HCl 750 mM (pH 9), KCl 500 mM, (NH₄)₂SO₄ 200 mM], 2 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µl de cada primer 50 µM (Invitrogen Life Technologies), 5 µl de la mezcla de desoxiribonucleótidos (dNTPs) (Bioline GC Biotech), 2 mM cada uno, 0,25 µl de la enzima *Taq* polimerasa (5 U/µl) (Biotools M&B Labs), 10-20 ng de ADN molde, y se completó el volumen de reacción con agua ultra pura estéril. Todas las muestras se analizaron por duplicado y se incluyeron dos controles negativos, que contenían agua ultra pura estéril reemplazando el ADN molde, para cada tanda de reacciones.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador iCycler (Bio-Rad). El protocolo utilizado para la amplificación de las regiones ITS consistió en: 2 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; 35 ciclos compuestos por 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C, y 1 minuto a 72°C; seguidos de 5 minutos de extensión final a 72°C. El protocolo utilizado para la región del gen RPB2 fue el descrito por Liu y col. (1999), compuesto por: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; 35 ciclos compuestos por 1 minuto a 95°C, 2 minutos a 55°C, y 1,5 minuto a 72°C; seguidos de 10 minutos de extensión final a 72°C.

La amplificación de cada muestra analizada se comprobó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1% p/v) con tampón TAE 0,5X (Tris 20 mM, ácido acético glacial 10 mM, EDTA 0,5 mM). Para cada reacción se cargaron 5 µl del producto de PCR homogenizado con 3 µl de tampón de carga de electroforesis [Tris-HCl 50 mM, sacarosa 0,25 g/ml, azul de bromofenol 1 mg/ml, SDS 5 mg/ml, SYBR Green I 2µl/ml (Roche Diagnostics)]; el SYBR Green I emite fluorescencia al unirse con el ADN amplificado. La electroforesis se desarrolló en un equipo Sub-Cell GT Cell (Bio-Rad) a 80 V durante 25 minutos. Los geles se observaron con un transiluminador ECX-26.MX (Vilber Lourmat) que emite luz U.V. a una longitud de onda de 312 nm. Las imágenes de los geles se captaron con un equipo Kodak EDAS-290 (Kodak) utilizando el programa “Kodak 1D v. 3.5.4. Imaging Scientific System” (Kodak).

Los productos amplificados se purificaron mediante el uso del kit JETquick Spin (Genomed) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis de secuencias de ADN

Los productos de PCR purificados se secuenciaron por duplicado en la empresa Secugen (CIB-CSIC, Madrid), con un secuenciador capilar ABI 3700 (Applied Biosystems), utilizando los mismos cebadores que para la PCR. Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit 7.0.5.3. (Hall 1999), estableciendo las secuencias consenso para cada marcador y cepa analizada. Éstas se compararon por alineamiento múltiple, para cada uno de los marcadores estudiados, utilizando la aplicación Muscle (Edgar 2004) incluida en la página web del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Todas aquellas secuencias que no fueron idénticas entre sí se depositaron en las bases de datos nucleotídicas (GenBank), utilizando la aplicación del Archivo Europeo de Nucleótidos (ENA), incluida en el EMBL-EBI. Sobre estas secuencias se realizó el correspondiente análisis de similitud utilizando el algoritmo BLASTn (Altschul y col. 1990), incluido en la página web del Centro Nacional de Información de Biología (NCBI, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), comparándose con todas las secuencias existentes en las bases de datos.

Análisis filogenético

A partir de los alineamientos múltiples, las relaciones filogenéticas entre las cepas de los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium* se establecieron utilizando el programa Mega 5 (Tamura y col. 2011). Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron los algoritmos “Neighbour-Joining” (Saitou y Nei 1987) y Máxima-Probabilidad. Los modelos de sustitución empleados para cada uno de los algoritmos fueron Kimura-2 parámetros (Kimura 1980) y Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa y col. 1985),

respectivamente. Las posiciones del alineamiento que presentaron espacios (“gaps”), donde alguna de las secuencias analizadas no alineó, no se tuvieron en cuenta. Para estimar el peso relativo que tienen cada una de las ramas del árbol, se realizó un análisis aleatorio (“bootstrap”) con 1.000 repeticiones. La topología resultante se comparó con la obtenida utilizando tres algoritmos diferentes: Máxima-Parsimonia, Mínima-Evolución, y “Un-weighted Pair Group Method using arithmetic Average” (UPGMA).

Adicionalmente, para estimar el parentesco genético entre las especies de los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium*, se elaboraron las matrices de distancias-p utilizando el programa Mega 5, para cada uno de los marcadores. La distancia-p entre dos secuencias es la proporción de sitios, correspondientes a nucleótidos o aminoácidos, en los que las dos secuencias son diferentes. Este valor se obtiene dividiendo el número de sitios con diferencias entre el número total de sitios comparados.

Identificación morfológica de especies de *Ochroconis-Scolecobasidium*

Para este tipo de estudio fue fundamental llevar a cabo una caracterización morfológica, tanto macroscópica (colonias desarrolladas en distintos medios de cultivo) como microscópica (características del micelio y estructuras de reproducción). En los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium* sólo se conocen las estructuras de reproducción asexual: conidióforos y conidios. La clasificación taxonómica de estos géneros se basa principalmente en leves diferencias de forma y tamaño de estas estructuras.

Este estudio morfológico se realizó en colaboración con la Dra. Alena Nováková, micóloga experta en taxonomía de hongos de cuevas, del Instituto de Biología del Suelo, Academia de Ciencias (ISB AS), České Budejovice, República Checa. Para ello, se seleccionaron once cepas aisladas de la cueva de Lascaux (Tabla 2), incluyendo aquellas que mostraron diferencias en alguno de los dos marcadores moleculares estudiados. Éstas se depositaron en la Colección de Hongos Microscópicos (CMF) del ISB

AS. También se estudiaron las cepas tipo de las especies más cercanas en función de los resultados moleculares obtenidos, *O. tshanytschae* y *O. anellii*.

Para caracterizar la morfología de la colonias y las estructuras microscópicas, las cepas se cultivaron en placas de tres medios de cultivos distintos: MEA, PDA (Patata-dextrosa-agar, Difco) y V8A (zum de ocho vegetales agar) [V8 (Campbell's) 200 ml/l, CaCO_3 2,5 g/l, agar 20 g/l] (Atlas 2010). Las placas se incubaron a 25°C durante 14 días, tras ello se describió la morfología de las colonias y se midió su diámetro. Cuando desarrollaron abundantes estructuras maduras de reproducción (1-2 meses), se realizaron las preparaciones microscópicas. El micelio teñido con lactofucsina (fucsina 0,1% en ácido láctico) se observó directamente con un microscopio óptico Axioskop 2 (Carl Zeiss). Para microscopía electrónica de barrido, bloques de medio de cultivo con micelio se fijaron inicialmente con una solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato (0,2M), y posteriormente con una solución de tetróxido de osmio al 2%. Se deshidrataron con soluciones seriadas de alcohol etílico y acetona, y se aplicó el método de punto crítico para el secado de la muestra. Las observaciones se realizaron en equipos JSM-6300 y JSM-7401f (Jeol).

Caracterización de especies de *Ochroconis-Scolecobasidium*

Crecimiento a distintas temperaturas

Se determinó la tasa de crecimiento a distintas temperaturas de dos de las cepas, LX A1 y LX CH16. Para ello, se sembraron por duplicado en placas de MEA, discos de un centímetro de diámetro que contenían micelio de colonias en crecimiento activo. Las placas se incubaron en oscuridad durante un mes a 5°C, 13°C (temperatura media de la cueva), 22°C, 30°C y 35°C. Tras ello, se midió el crecimiento axial de las colonias y se calculó la tasa media de crecimiento expresada en milímetros por mes (mm/mes).

Tolerancia al cloruro de benzalconio

Se evaluó la tolerancia de las cepas LX A1, LX CH16 y LX CH40 al cloruro de benzalconio (BC), principal compuesto biocida aplicado en la cueva de Lascaux. Para ello se realizaron dos ensayos con metodología ligeramente diferente.

Debido a la escasa y lenta esporulación de las cepas de *Ochroconis-Scolecobasidium*, no fue posible obtener suspensiones de conidios útiles para inocular los diferentes ensayos de caracterización. Por ello, se trabajó con suspensiones homogéneas de micelio que se prepararon según las necesidades del ensayo en cuestión.

En este ensayo las cepas LX A1 y LX CH16 se cultivaron sobre placas de MEA hasta obtener la biomasa suficiente para extraer discos de un centímetro de diámetro. Éstos se traspasaron a tubos Eppendorf que contenían 1 ml de agua destilada estéril y perlas de vidrio de 2 y 4 mm de diámetro. La mezcla se homogenizó durante un minuto a una velocidad de 5,5 m/s en un equipo Fast-Prep 24. Alícuotas de 100 µl de la suspensión obtenida se sembraron por duplicado en placas de MEA que contenían concentraciones crecientes de BC, dispersando homogéneamente el inóculo con asa de Drigalski. Se evaluó la capacidad de crecimiento del hongo a los 10 días de incubación a 22°C en oscuridad.

El BC utilizado (Sigma-Aldrich) contiene predominantemente $C_{12}H_{25}N(CH_3)_2C_7H_7Cl$, aunque también homólogos de C_{14} y C_{16} . Las concentraciones de BC ensayadas en este primer ensayo fueron las siguientes: 50, 100, 250, 500, 750, 1.000, 2.500, 5.000, 7.500, 10.000 y 12.500 mg/l. Éstas se seleccionaron teniendo en cuenta los últimos tratamientos biocidas aplicados en la cueva. En enero de 2008 se realizaron pulverizaciones con una solución acuosa de Devor Mousse al 5%, que tiene una concentración de BC comprendida entre 5.000-12.500 mg/l, según las indicaciones del fabricante.

Posteriormente, se evaluó la tolerancia al BC de la cepa LX CH40 siguiendo una metodología ligeramente diferente. Se sembraron por duplicado placas de MEA que contenían concentraciones crecientes de BC (100, 500, 1.000, 5.000 y 10.000 mg/l) con discos de 4 mm de diámetro que contenían micelio de colonias en crecimiento activo. Las placas se incubaron en oscuridad durante un mes a 22°C. Tras ello, se midió el crecimiento axial de las colonias y se calculó la tasa media de crecimiento expresada en milímetros por mes (mm/mes), estimando el efecto de las distintas concentraciones de BC sobre el crecimiento del hongo.

Análisis de ácidos grasos

Se caracterizó el perfil de ácidos grasos de ocho de las cepas aisladas de la cueva de Lascaux (Tabla 2) y de las cinco cepas de referencia del CBS (Tabla 3). El análisis se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del sistema de identificación MIDI y el protocolo de extracción descrito por Miller y Berger (1985). Las cepas se cultivaron en matraces Erlenmeyer que contenían 100 ml del medio líquido ME (extracto de malta 20 g/l). Los matraces se inocularon con micelio procedente de colonias en crecimiento activo sobre placas de MEA, y se incubaron en agitación (150 rpm) durante cuatro días a 22°C. La biomasa resultante se separó del medio de cultivo por centrifugación a 3.500 rpm, se lavó dos veces con agua destilada estéril para eliminar cualquier resto de medio de cultivo, y se eliminó el exceso de agua

sobre papel de filtro. Se recogieron aproximadamente 25-50 mg de micelio en tubos de vidrio y se procedió al protocolo de extracción de los ácidos grasos. Cada cepa se analizó por triplicado.

Para la extracción de los ácidos grasos, inicialmente se añadió 1 ml del reactivo de saponificación (metanol:agua destilada 1:1 v/v, NaCl 150 g/l), se agitó y se incubó 30 minutos en un baño de agua a 100°C, posteriormente se enfriaron los tubos en agua a temperatura ambiente. En este paso de saponificación el calor provoca la rotura de las células. A continuación se añadieron 2 ml del reactivo de metilación (metanol:HCl 6N 1:1,18 v/v), se agitó y se incubó 10 minutos a 80°C, enfriándose rápidamente pasado este tiempo. Este paso origina los ésteres metílicos de los ácidos grasos, incrementando su volatilidad para el análisis por cromatografía de gases. Posteriormente se añadió 1,25 ml del reactivo de extracción (hexano:metil-butyl-eter 1:1 v/v) y se agitó suavemente por volteo durante 10 minutos. Tras ello, se recuperó la fase orgánica superior donde quedaron retenidos los ácidos grasos y se lavaron añadiendo 3 ml de una solución de NaOH al 1,2% (p/v), agitándose por volteo durante 5 minutos. Se recuperó de nuevo la fase orgánica en un micro vial evitando cualquier contaminación.

Las muestras se analizaron utilizando un cromatógrafo de gases HP-6890 (Hewlett-Packard) equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de sílice Ultra-2 (Hewlett-Packard)(25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m; fenil-metil-silicona). El gas portador utilizado fue hidrógeno. Las condiciones de temperatura fueron desde 170°C a 260°C, con incremento de temperatura de 5°C al minuto. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 260°C y 280°C, respectivamente. Los ácidos grasos se identificaron en función de su tiempo de retención, usando la base de datos del programa Sherlock MIDI versión 4.5. Para comparar los perfiles de ácidos grasos obtenidos en las distintas cepas analizadas, se llevó a cabo un análisis de componentes principales utilizando el programa informático anteriormente citado.

Caracterización de fuentes de carbono

Se analizaron cinco de las cepas aisladas de la cueva de Lascaux (Tabla 2) y las cinco cepas de referencia del CBS (Tabla 3). Para determinar las fuentes de carbono asimilables por ellas, se utilizaron las placas multipocillos FF-MicroPlate (Biolog) (Fig. 10). Con ellas se evaluaron 95 fuentes de carbono distintas, siendo un sistema útil para caracterizar un amplio rango de hongos filamentosos y levaduras (dela Cruz y col. 2006b).

La preparación del inóculo fúngico se realizó a partir de cultivos en placas de MEA con papel de celofán estéril en su superficie, permitiendo la recuperación del micelio libre de medio de cultivo. Aproximadamente un centímetro cuadrado de micelio se transfirió a tubos Eppendorf que contenían 1 ml de la solución de inoculación FF [Phytigel (Sigma-Aldrich) 2,5 g/l; Tween 40 0,3 g/l] estéril y perlas de vidrio de 2 y 4 mm de diámetro. La mezcla se homogenizó durante dos minutos a una velocidad de 5,5 m/s en el equipo Fast-Prep 24. La suspensión resultante se transfirió a tubos de borosilicato y se ajustó a un 75% de turbidez utilizando el turbidímetro de Biolog, añadiendo solución de inoculación FF. Las placas multipocillo se inocularon siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadió a cada pocillo 100 µl de la suspensión micelial del hongo a evaluar. Las placas se incubaron en oscuridad a 22°C durante 10 días. Cuando se oxidaron las fuentes de carbono se incrementó la actividad mitocondrial y se produjo un pigmento rojo anaranjado que aumenta la densidad óptica a 490 nm. Además, el crecimiento del hongo en el pocillo incrementó la turbidez aumentando la densidad óptica medida a 490 y 750 nm. Se realizaron medidas de absorbancia a 490 y 750 nm a los 3, 6 y 10 días, y se comprobó que los resultados más significativos se obtenían comparando las medidas de absorbancia a 490 nm a los 10 días de incubación. Para interpretar los resultados se estableció una escala para las medidas de absorbancia a 490 nm: los valores comprendidos entre 0 y 1 correspondieron a las reacciones negativas o dudosas y los valores mayores de 1 se consideraron reacciones positivas.

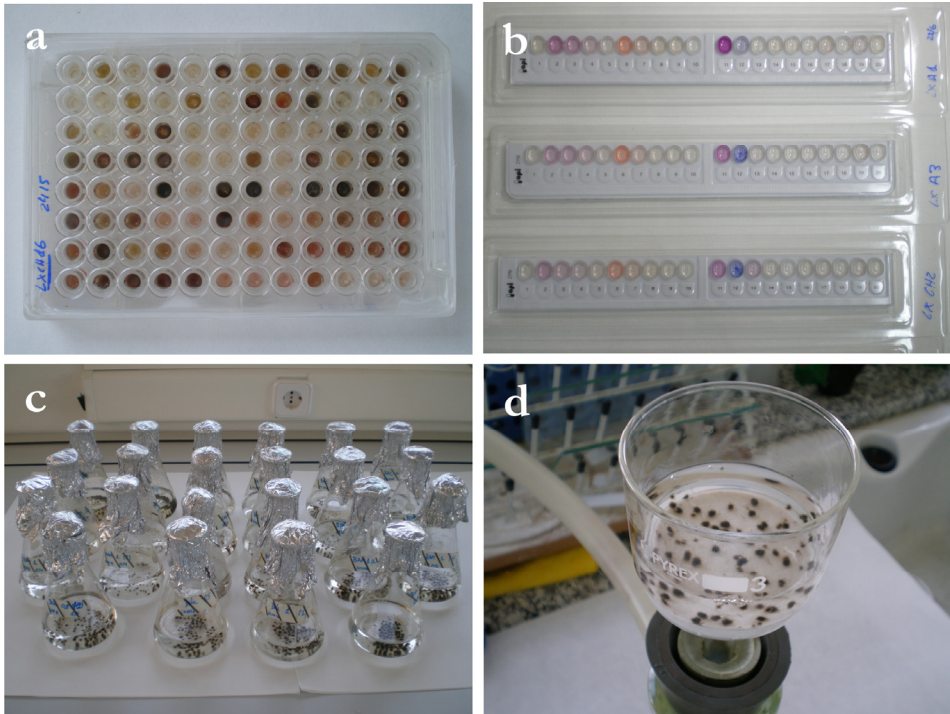


Figura 10. Métodos empleados para caracterizar los requerimientos nutricionales de las especies de *Ochroconis-Scolecobasidium*. **a.** Sistema Biolog para caracterizar las fuentes asimilables de carbono. **b.** Sistema Api Zym para evaluar la actividad de una serie de enzimas degradativas. **c y d.** Ensayos de evaluación de distintos productos como fuentes de carbono y nitrógeno: cultivos (c) y recuperación de la biomasa resultante por filtración (d).

En un experimento adicional, se evaluó la capacidad de la cepa LX CH16 de utilizar como fuente de carbono el BC o algunos de los productos de su degradación. Se seleccionaron los siguientes productos de degradación descritos por Patraucham y Oriel (2003): benzildimetilamina (BDAM), benzilamina (BAM) y ácido benzoico (BA); este último compuesto se cambió por el benzoato de sodio (BNa) por su solubilidad en agua. Se ensayaron tres concentraciones de BC, 100, 500 y 1.000 mg/l. Las concentraciones de los productos de degradación BDAM, BAM y BNa fueron 0,5 y 1 mmol/l, basadas en los ensayos de Patraucham y Oriel

(2003). Previamente se comprobó que ninguno de estos tres subproductos, a estas concentraciones, inhibió el crecimiento de este hongo en placas de MEA.

El ensayo se basó en el cultivo del hongo en solución Czapek sin sacarosa como fuente de carbono [NaNO_3 2 g/l, K_2HPO_4 1 g/l, KCl 0,5 g/l, MgSO_4 0,5 g/l, FeSO_4 0,01 g/l] (Atlas, 2010), al cual se añadió el producto a evaluar como única fuente de carbono. Se añadieron controles negativos (sin fuente de carbono) y positivos (solución Czapek convencional, con sacarosa 30 g/l). Se ensayaron dos réplicas para cada uno de los tratamientos. Se prepararon un total de 22 matraces Erlenmeyer con 100 ml del medio cultivo esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Se enfriaron hasta alcanzar la temperatura ambiente y se añadieron los diferentes productos a ensayar, previamente esterilizados por filtración con filtros de acetato de celulosa de 0,2 μm de diámetro de poro.

Para preparar el inóculo fúngico, micelio de la cepa LX CH16 en crecimiento activo se cultivó en 150 ml de ME en un matraz Erlenmeyer, a 22°C en agitación constante (150 rpm) durante un mes. La abundante biomasa obtenida se centrifugó a 3.500 rpm eliminando el medio de cultivo. Se realizaron dos lavados con agua destilada estéril para eliminar cualquier resto del medio de cultivo que pudiera aportar fuente de carbono al experimento, y la biomasa se resuspendió en 150 ml de agua destilada estéril. Cada uno de los 22 matraces del experimento se inoculó con 5 ml de la suspensión homogénea de micelio, correspondiente a un 1 mg de biomasa (peso seco)(Fig. 10c). Adicionalmente, se sembraron con el mismo inóculo dos placas de MEA para verificar que éste no se hubiera contaminado con la manipulación. Los matraces se incubaron en agitación continua (150 rpm) a 22°C durante un mes. La biomasa resultante se recuperó por filtración con bomba de vacío (Fig. 10d), se secó y se calculó el incremento de biomasa para cada tratamiento. Los valores medios, para cada uno de los tratamientos, se compararon estadísticamente aplicando el Test de Fisher utilizando el programa SPSS (IBM).

Adicionalmente, se evaluó la capacidad de las cepas LX A1 y LX CH40 de utilizar distintos compuestos aromáticos (ácido vanílico, p-toluensulfonato sódico y tolueno) como fuentes de carbono. En éstos ensayos también se evaluaron otras especies de hongos aisladas de manchas negras en este estudio, por ello, la metodología y los resultados obtenidos en este experimento se detallan en el capítulo 4.

Caracterización de fuentes de nitrógeno

Para determinar las fuentes de nitrógeno asimilables por la cepa LX CH16 se realizó un ensayo siguiendo la metodología anteriormente descrita (Fig. 10 c,d), los cultivos se desarrollaron en solución Czapek sin nitrato sódico como fuente de nitrógeno, a la cual se añadió el producto a evaluar. Se evaluaron distintos tipos de fuentes de nitrógeno: nitrato (NaNO_3), nitrito (NaNO_2) y amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$. Además, se analizaron dos de los productos de la degradación del BC: BDAM y BAM. La concentración de los productos evaluados se ajustó para aportar la misma cantidad de nitrógeno (0,32 g/l) que los 2 g de nitrato sódico que presenta la solución Czapek convencional. Se ensayaron tres réplicas para cada uno de los tratamientos, y se añadieron controles negativos (sin fuente de nitrógeno). Se prepararon un total de 18 matraces Erlenmeyer con 100 ml del medio cultivo, añadiendo las sales a evaluar, NaNO_3 , NaNO_2 y $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, a los matraces correspondientes. Éstos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. La BDAM y BAM se esterilizaron por filtración y se añadieron sobre el medio estéril a temperatura ambiente. La inoculación, incubación, registro y procesamiento de los datos se realizó como se detalla para el experimento anterior.

Enzimas degradativas

Se caracterizó la presencia de distintas enzimas en las diferentes especies de *Ochroconis* y *Scolecobasidium*. Se analizaron nueve de las cepas aisladas de la cueva de Lascaux (Tabla 2), y las cinco cepas de referencia del

CBS (Tabla 3). Se utilizó el sistema Api Zym (BioMérieux), un método semicuantitativo para evaluar 19 actividades enzimáticas (Fig. 10b), siguiendo las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Se añadió a cada pocillo 65 µl de una suspensión micelial de la cepa a evaluar. Este inóculo fúngico se preparó siguiendo la metodología descrita para el sistema Biolog, con la única diferencia de usar agua destilada estéril en lugar de la solución de inoculación FF. Las galerías se incubaron a 30°C en oscuridad durante 4h. Tras ello, se añadió una gota de los reactivos Zym A y Zym B, y se esperó diez minutos, bajo luz blanca, a que se desarrollara la reacción colorimétrica. Los resultados se registraron de acuerdo con una escala del 0-4, según la intensidad de color, pudiendo extrapolarse a la siguiente escala semicuantitativa, según la cantidad de sustrato hidrolizado: 0 (no hay hidrólisis), 1 (<20 nmol), 2 (20-40 nmol), 3 (40-80 nmol), y 4 (>80 nmol) (dela Cruz y col. 2006b).

Resultados y discusión

Identificación de especies de *Ochroconis-Scolecobasidium*

En este estudio, mediante el análisis molecular de los marcadores filogenéticos ITS y RPB2, y el análisis morfológico, se determinó la identificación de los hongos anteriormente descritos como *Scolecobasidium* o *Ulocladium* (Bastian y col. 2009d, Orial y col. 2011), principalmente asociados a las manchas negras que aparecieron sobre las paredes y bóvedas de roca caliza del Pasaje, Nave y Ábside.

Los resultados obtenidos permitieron la descripción molecular y morfológica de dos nuevas especies del género *Ochroconis*, a las que pertenecen las cepas aisladas de la cueva de Lascaux. Se estimó la variabilidad genética de estas especies y sus relaciones filogenéticas con las especies de referencia incluidas en este estudio.

Identificación molecular

Comparando las secuencias ITS y RPB2 de las 30 cepas de *Ochroconis-Scolecobasidium* procedentes de la cueva de Lascaux, se diferenciaron claramente dos grupos (Figs. 11 y 12). El primero de ellos incluye 28 de las cepas y el segundo está compuesto por las cepas LX CH40 y LX M1-3. Dentro del grupo mayoritario se encuentra la cepa LX PDA, anteriormente identificada como *Ulocladium* sp. por el LRMH, lo que demuestra que pertenece a la misma especie que el resto de las cepas incluidas en este grupo. Las secuencias ITS de este grupo fueron muy homogéneas, con una longitud aproximada de 620 pb. Tan sólo se apreciaron ligeras diferencias en algunas de las cepas, de uno a dos pares de bases en longitud y de uno a cuatro nucleótidos en secuencia. Basándose en ellas, como muestra la Figura 11, se diferenciaron siete subgrupos y se seleccionó una cepa representativa de cada uno de ellos para incluirla en los posteriores análisis filogenéticos. Sólo se depositaron en GenBank las secuencias de estas cepas representativas, evitando así la redundancia de datos idénticos. La cepa LX

A1 fue representativa de 16 cepas con secuencia idéntica. En cuanto al gen RPB2 (Fig. 12), las 28 cepas de este grupo tuvieron secuencias con longitud comprendida entre 1.051 y 1.133 pb, 23 de las cuales fueron idénticas (incluyendo la secuencia de LX A1), tres difieren tan sólo en un nucleótido (LX 7.2, LX 21T-2 y LX PDA), y las dos restantes acumulan un total de 31 nucleótidos diferentes (LX 101R-6 y LX 107X-8). Sin embargo, al comparar las secuencias de aminoácidos de RPB2 todas fueron idénticas.

Dentro del segundo grupo, las cepas LX CH40 y LX M1-3, tuvieron idénticas secuencias para ambos marcadores, cuya longitud fue de 736 pb para ITS y de 1.033 pb para RPB2.

Cuando las secuencias resultantes del grupo mayoritario se compararon con las depositadas en GenBank mediante el algoritmo BLASTn (NCBI), los resultados fueron idénticos para 28 de las cepas. Las secuencias de GenBank que presentaron los mayores porcentajes de identidad nucleotídica correspondieron a *S. tshanytschae* (83% de identidad con respecto a un 88% de cobertura de alineamiento, en el análisis del marcador ITS) y *S. variable* (84% de identidad con respecto a un 75% de cobertura de alineamiento, en el análisis del marcador RPB2); ambas nomenclaturas son actualmente consideradas sinónimas de la especie *O. tshanytschae*. El resultado BLASTn de las secuencias RPB2 de LX CH40 y LX M1-3 fue similar, siendo las secuencias de *S. variable* las más parecidas (85% de identidad con un 77% de cobertura). Sin embargo, sus secuencias ITS no alinearon significativamente con ninguna de las secuencias depositadas en GenBank, ya que distintas especies de *Scolecobasidium* dieron porcentajes de cobertura de alineamiento menores al 54%. Cabe destacar, que los porcentajes de identidad obtenidos para los dos grupos de cepas aisladas de la cueva de Lascaux fueron bastante bajos (83-85%), indicando que esos grupos pertenecen a especies distintas de aquellas depositadas en GenBank.

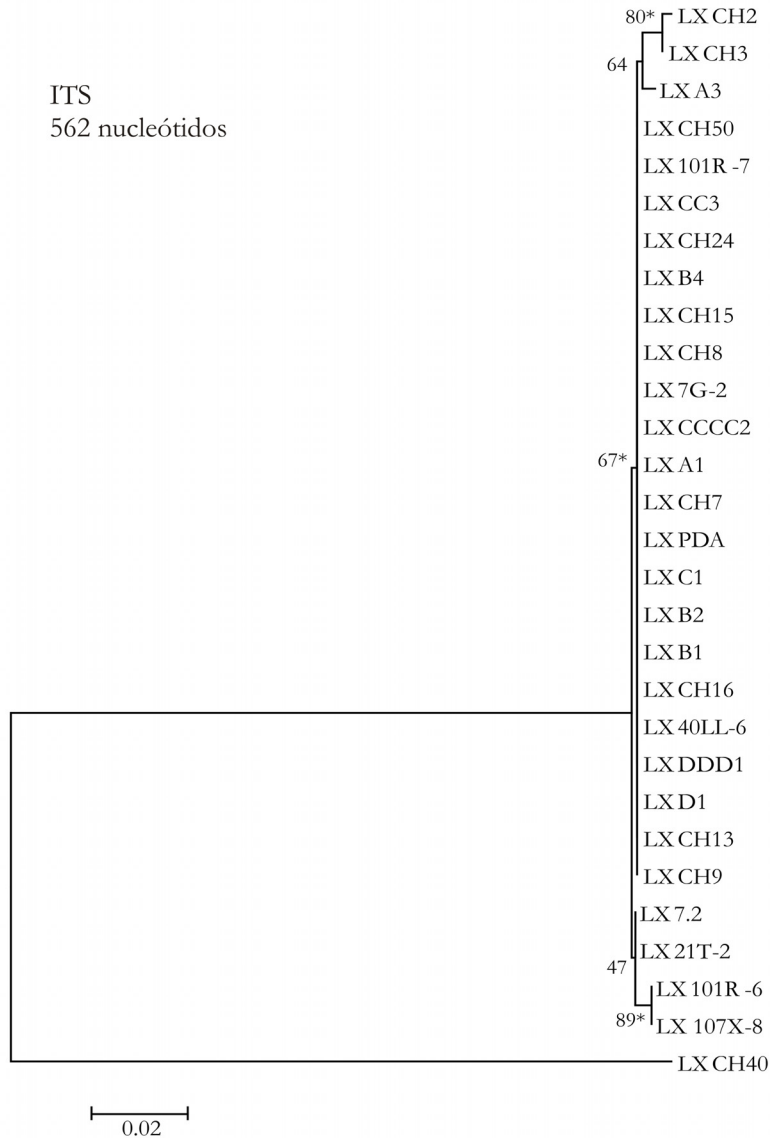


Figura 11. Relaciones filogenéticas entre las cepas de *Ochroconis-Scolecobasidium* aisladas de la cueva de Lascaux, basadas en el análisis de la región ITS. El árbol no enraizado se obtuvo aplicando el método “Neighbour-Joining” y el modelo de substitución Kimura 2-parámetros. Los valores “bootstrap” se expresan como porcentajes de 1.000 réplicas. Los asteriscos indican los nudos del árbol que también se obtuvieron utilizando los algoritmos de Mínima-Evolución y Máxima-Parsimonia. La barra representa 0,02 cambios de nucleótidos por posición.

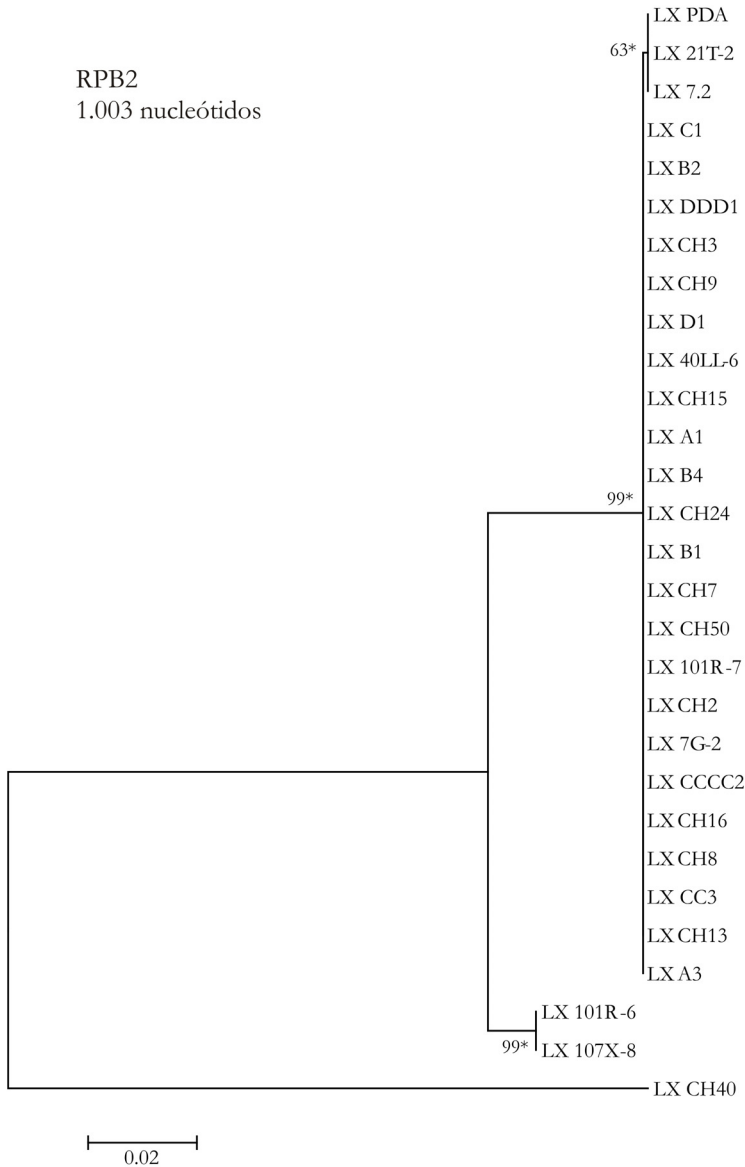


Figura 12. Relaciones filogenéticas entre las cepas de *Ocrobacillus-Scolecobasidium* aisladas de la cueva de Lascaux, basadas en el análisis de la región RPB2. El árbol no enraizado se obtuvo aplicando el método “Neighbour-Joining” y el modelo de sustitución Kimura 2-parámetros. Los valores “bootstrap” se expresan como porcentajes de 1.000 réplicas. Los asteriscos indican los nudos del árbol que también se obtuvieron

utilizando los algoritmos de Mínima-Evolución y Máxima-Parsimonia. La barra representa 0,02 cambios de nucleótidos por posición.

Inicialmente, se analizaron las relaciones filogenéticas entre las diferentes cepas de *Ochroconis* aisladas de la cueva y las secuencias homólogas más cercanas procedentes de GenBank (no se muestran). Los árboles filogenéticos obtenidos no fueron coherentes. El problema que planteó esta aproximación es que las secuencias depositadas en GenBank de los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium* eran muy escasas y con una identificación poco fiable, como muestra la filogenia elaborada por Hamayun y col. (2009). Por ello, se incluyeron en los análisis las cepas de referencia obtenidas de la colección del CBS, y sólo se utilizaron las siguientes secuencias de GenBank: una secuencia ITS de la cepa IFM 52605 de *Ochroconis gallopava* (AB125284) para establecer su posición filogenética dentro del género, y tres secuencias de la cepa NRRL 4791 de *Aspergillus versicolor* (ITS, EF652478; RPB2, EF652214/ABW72415, nucleótidos/aminoácidos respectivamente) utilizada como grupo externo para enraizar los árboles filogenéticos.

Las regiones ITS de las cinco cepas de referencia mostraron longitudes variables, comprendidas entre los 574 pb para *S. terreum* (CBS 536.69) y los 729 pb para *O. tshawnytschae* (CBS 100438). Además, cuando se realizó el alineamiento múltiple comparando las cepas representativas de la cueva de Lascaux con las cepas de referencia de distintas especies, se introdujeron numerosos “gaps”, principalmente localizados en las regiones ITS1 e ITS2. Éstos pueden deberse a eventos de inserción-delección frecuentes en estas regiones variables. En los análisis filogenéticos, las posiciones que contenían “gaps” se eliminaron previamente y el árbol resultante estuvo basado en la comparación de 398 posiciones nucleotídicas alineadas (Fig. 13). Sin embargo, aunque las secuencias del gen RPB2 de las distintas especies tuvieron longitud variable (entre los 759 pb de *O. constricta* CBS 211.54 y los 1.110 pb para *O. anellii* CBS 284.64), éstas se alinearon perfectamente sin introducir “gaps” relevantes y los árboles filogenéticos se generaron basándose en la comparación de 688 nucleótidos y 225

aminoácidos (Fig. 14). Los números de acceso de GenBank de todas las secuencias incluidas en estos análisis se detallan en las Figuras 13 y 14.

Las relaciones filogenéticas establecidas entre las cepas seleccionadas de la cueva de Lascaux y las cepas de referencia de otras especies fueron similares analizando ambos marcadores (Figs. 13 y 14). Además, al combinar las secuencias de ambos marcadores se obtuvo un árbol filogenético que establecía idénticas relaciones (Fig. 15).

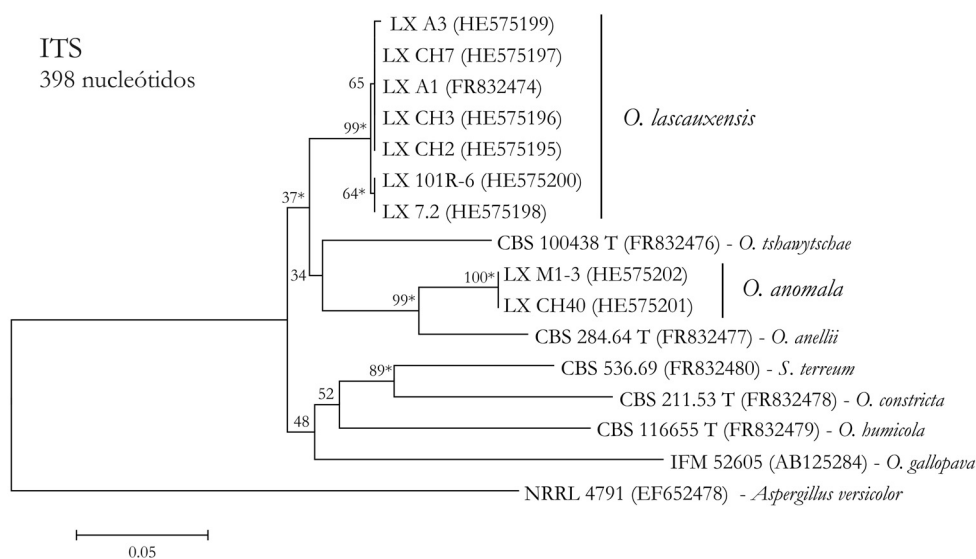


Figura 13. Relaciones filogenéticas entre las dos nuevas especies de *Ochroconis* aisladas de la cueva de Lascaux y las cepas de referencia, basadas en el análisis de la región ITS. Sólo se incluyen siete cepas de *O. lascauxensis* que tienen diferentes secuencias. El árbol se obtuvo aplicando el método “Neighbour-Joining”, el modelo de substitución Kimura 2-parámetros, y enraizado utilizando *Aspergillus versicolor* NRRL4791 como grupo externo. Los valores “bootstrap” se expresan como porcentajes de 1.000 réplicas. Los asteriscos indican los nudos del árbol que también se obtuvieron utilizando los algoritmos de Mínima-Evolución, Máxima-Parsimonia y UPGMA. La barra representa 0,05 cambios de nucleótidos por posición.

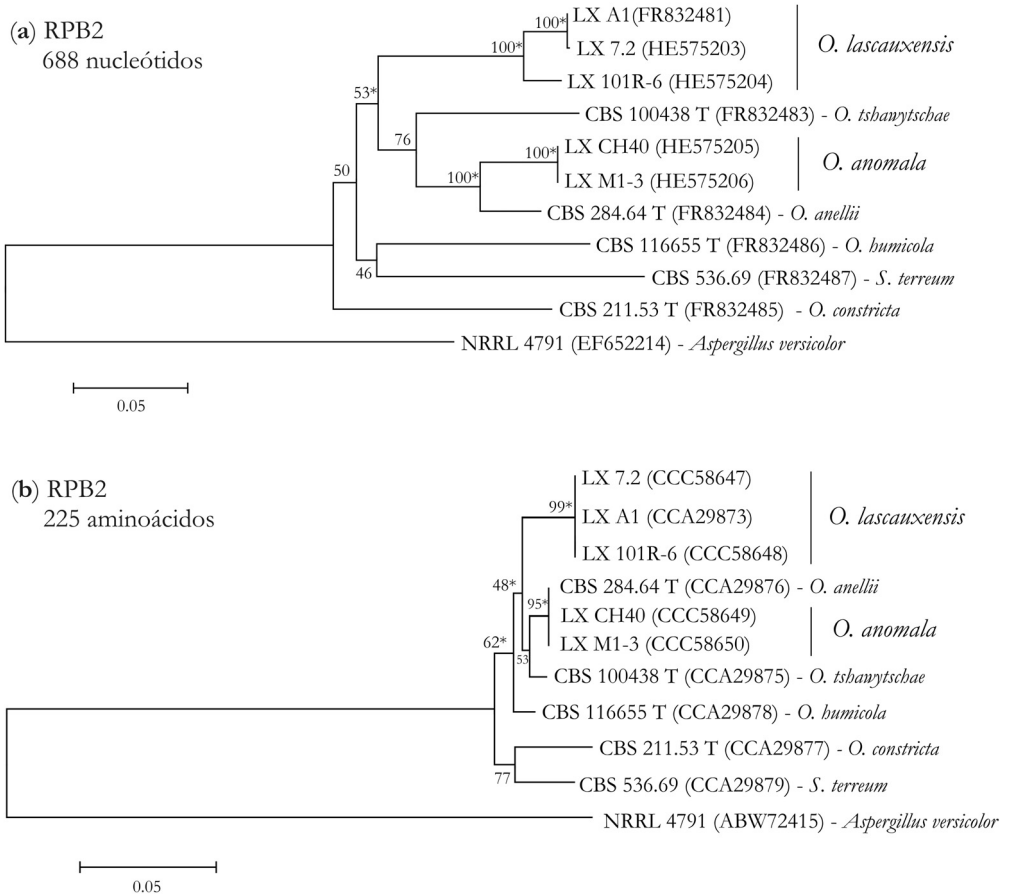


Figura 14. Relaciones filogenéticas entre las dos nuevas especies de *Ochroconis* aisladas de la cueva de Lascaux y las cepas de referencia, basadas en el análisis de la secuencias nucleotídicas (a) y aminoácidas (b) de la región RPB2. Sólo se incluyen tres cepas de *O. lascauxensis* que tienen secuencias diferentes. Los árboles se obtuvieron aplicando el método “Neighbour-Joining”, el modelo de sustitución Kimura 2-parámetros para nucleótidos y el modelo de distancias-p para aminoácidos. Los árboles se enraizaron utilizando *Aspergillus versicolor* NRRL4791 como grupo externo. Los valores “bootstrap” se expresan como porcentajes de 1.000 réplicas. Los asteriscos indican los nudos del árbol que también se obtuvieron utilizando los algoritmos de Mínima-Evolución, Máxima-Parsimonia, UPGMA y Máxima-Probabilidad. La barra representa 0,05 cambios de nucleótido por posición.

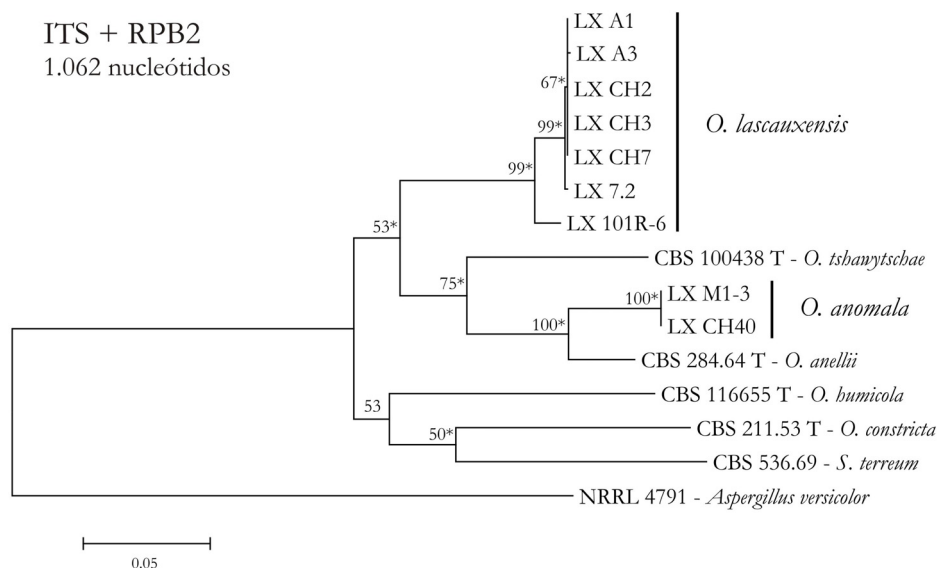


Figura 15. Relaciones filogenéticas entre las dos nuevas especies de *Ochroconis* aisladas de la cueva de Lascaux y las cepas de referencia, basadas en el análisis combinado de las secuencias nucleotídicas de las regiones ITS y RPB2. Sólo se incluyen siete cepas de *O. lascauxensis* que tienen diferentes secuencias ITS. El árbol mostrado fue el obtenido con un mayor valor “Log Likelihood” (-53191), aplicando el método de Máxima-Probabilidad y el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano. Éste fue enraizado utilizando *Aspergillus versicolor* NRRL4791 como grupo externo. Los valores “bootstrap” se expresan como porcentajes de 1.000 réplicas. Los asteriscos indican los nudos del árbol que también se obtuvieron utilizando los algoritmos de Mínima-Evolución, Máxima-Parsimonia y UPGMA. La barra representa 0,05 cambios de nucleótidos por posición.

Todas las cepas que representan el grupo mayoritario de la cueva de Lascaux se agruparon en un clado independiente apoyado por un valor “bootstrap” del 99%. Estas 28 cepas pertenecen a una nueva especie de *Ochroconis*, para la que se ha propuesto el nombre de *O. lascauxensis*, debido a su amplia distribución en la cueva de Lascaux. De la misma manera, las cepas LX CH40 y LX M1-3 se agruparon en un clado independiente, apoyado por un valor “bootstrap” del 100%. Estas dos cepas pertenecen otra nueva especie denominada *O. anomala*, debido a que mostró un tipo de

conidiogénesis anómala, como se detalla en el apartado de identificación morfológica.

En la Tabla 4 se detallan las matrices de distancia-p entre las distintas especies de *Ochroconis-Scolecobasidium*, siendo este valor (p) la proporción de posiciones comparadas, de nucleótidos o aminoácidos, donde dos secuencias fueron diferentes. Las posiciones con “gaps” no se tuvieron en cuenta. Las distancias entre las especies, excepto entre *O. anomala* y *O. anellii*, fueron elevadas, siendo $\geq 0,10$ (90% de identidad) para el marcador ITS, $\geq 0,11$ (89% de identidad) para las secuencias de nucleótidos de RPB2 y $\geq 0,02$ (98% de identidad) para las secuencias de aminoácidos de RPB2, lo cual confirma que corresponden a especies independientes. La especie *O. anellii* es la más cercana a *O. anomala*, con valores de distancia de 0,10 para las secuencias ITS y de 0,06 para las secuencias de nucleótidos de RPB2, incluso poseen idéntica secuencia de aminoácidos en el fragmento analizado de este gen.

Las dos nuevas especies aisladas en la cueva de Lascaux formaron un clado consistente con *O. tshanytschae* y *O. anellii*, que se repitió al analizar ambos marcadores con diferentes algoritmos. Sin embargo, la relación filogenética de este clado con el resto de especies, *O. constricta*, *O. humicola*, *S. terreum* y *O. gallopava*, es más distante (Figs. 13-15).

La baja variabilidad genética encontrada entre las 28 cepas de *O. lascauxensis* se localizó principalmente en las regiones ITS, ésta pudo ser ocasionadas por mutaciones puntuales frecuentes en las regiones que no codifican proteínas. Únicamente dos de las cepas, LX 101R-6 y LX 107X-8, aisladas en febrero de 2010 del Pasaje y Nave, respectivamente, mostraron diferencias significativas en sus secuencias nucleotídicas del gen RPB2, aunque no variaron la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante. El origen de este fenómeno es desconocido, puede deberse a mutaciones espontáneas o inducidas por los biocidas aplicados para el control de los brotes fúngicos, quizás puede ser indicativo de que la introducción de esta

Tabla 4. Matriz de distancias-p entre las diferentes especies de *Ochroconis-Scolecobasidium*.

	<i>Ol</i>	<i>Oa</i>	<i>Ot</i>	<i>Oan</i>	<i>Oc</i>	<i>Ob</i>	<i>St</i>
	LXA1	LXCH40	CBS100438	CBS284.64	CBS211.53	CBS116655	CBS536.69
ITS (nucleótidos)^a							
LXA1							
LXCH40	0.13						
CBS100438	0.10	0.14					
CBS284.64	0.13	0.10	0.14				
CBS211.53	0.17	0.20	0.20	0.19			
CBS116655	0.17	0.20	0.20	0.22	0.21		
CBS536.69	0.16	0.15	0.19	0.15	0.16	0.19	
RPB2 (nucleótidos)^b							
LXA1							
LXCH40	0.16						
CBS100438	0.14	0.12					
CBS284.64	0.15	0.06	0.11				
CBS211.53	0.18	0.17	0.18	0.16			
CBS116655	0.17	0.16	0.18	0.16	0.18		
CBS536.69	0.18	0.18	0.20	0.17	0.19	0.18	
RPB2 (aminoácidos)^c							
LXA1							
LXCH40	0.03						
CBS100438	0.03	0.02					
CBS284.64	0.08	0.00	0.02				
CBS211.53	0.03	0.06	0.07	0.06			
CBS116655	0.06	0.02	0.03	0.02	0.06		
CBS536.69	0.06	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	

^a: Datos ITS basados en la comparación de 444 nucleótidos.

^b: Datos RPB2 basados en la comparación de 703 nucleótidos.

^c: Datos RPB2 basados en la comparación de 233 aminoácidos.

Abreviaturas: *Ol*: *Ochroconis lascauxensis*; *Oa*: *Ochroconis anomala*; *Ot*: *Ochroconis tschanytschae*; *Oan*: *Ochroconis anelli*; *Oc*: *Ochroconis constricta*; *Ob*: *Ochroconis humicola*; *St*: *Scolecobasidium terreum*.

especie en la cueva se han producido en diferentes ocasiones, del mismo modo que plantea Dupont y col. (2007) para *F. solani* en años anteriores. Las vías de entrada en la cueva pudieron ser diversas, desde los suelos situados encima de la cueva a través del agua o por el transporte mediado por insectos cavernícolas como el colémbolo *F. candida*, en su superficie corporal o en sus excrementos (Bastian y col. 2010). Por otro lado, las dos cepas de *O. anomala* tuvieron idénticas secuencias en los dos marcadores analizados. Estos datos resultan insuficientes para extraer información alguna sobre la variabilidad genética de esta especie.

Identificación morfológica

Se llevó a cabo el estudio morfológico de once cepas aisladas de la cueva de Lascaux (Tabla 2), que representan la variabilidad molecular encontrada, y las dos cepas de referencia de las especies más cercanas *O. tshanytschae* y *O. anellii*. Los resultados obtenidos confirmaron la existencia de dos nuevas especies del género *Ochroconis*, cuyas descripciones taxonómicas se detallan a continuación:

Ochroconis lascauxensis A. Nováková y P.M. Martin-Sanchez, sp. nov.

Código Mycobank: MB561938

Etimología: el epíteto específico es el adjetivo creado con el nombre de la cueva, debido a la localización de esta especie y a su amplia distribución en las diferentes salas de la cueva.

Descripción en latín:

Coloniae in MEA, ad 25°C, 13-22 mm in diametro post 14 dies, velutinae ad floccosae, granulosae ad funiculosae se manifestant in partis centralis, olea viridae, olivaceo-cineraceae vel olivaceo-viridae nigricansae cum reversum olivaceo-viride nigricans. Aequae similes coloniae in PDA et V8A sunt, at multo magis floccosae ad funiculosae in V8A. Hyphae subhyalinae ad dilucide brunnae, conidiophorae erectae, quandocumque flexuosae, unicellulares, dilucide olivaceo-viridae cum terminae hyalinae, glabrae, 12,6-

14,4 x 1,8-2,25 μm . Conidia olivaceo-brunnea, 2-3 septata, in denticulae epiphysae crescerae, facile constricta ad septa, verrucosa vel tuberculosa, cum apiculate basis et residua denticulae 11,2-14,1 x (2,8-)3,5(-4,2) μm . Chlamydosporae absentae.

Descripción:

Colonias crecidas durante 14 días sobre MEA a 25°C con diámetros comprendidos entre 13 y 22 mm, aspecto plano, superficie de aterciopelada a flocosa, algunas colonias con superficie granular o apariencia funiculosa en la zona central, con margen sumergido 0,5 mm, de color verde oliva-verde oliva grisáceo en el anverso y las mismas tonalidades pero oscurecidas al reverso con la parte central de color oliva grisáceo. Las colonias crecidas sobre PDA tuvieron unos diámetros comprendidos entre 9 y 25 mm, aspecto plano, superficie de aterciopelada a flocosa con apariencia funiculosa en la zona central, de color verde oliva grisáceo en el anverso y verde oliva oscuro en el reverso con la parte central de color oliva oscuro. Las colonias crecidas sobre V8A tuvieron unos diámetros comprendidos entre 17 y 25 mm, aspecto plano, superficie predominantemente flocosa y/o funiculosa, con el margen sumergido 1-2,5 mm, de color verde oliva grisáceo-verde oliva grisáceo oscuro en el anverso y verde oliva oscuro en el reverso con la parte central de color oliva oscuro (Fig. 16a-c).

Hifas subhialinas de color pardo. Conidióforos rectos y cilíndricos, frecuentemente algo flexuosos, formados por una sola célula o septados, con superficie lisa, de color oliva pálido a veces con la zona superior hialina, tamaño de 12,6-14,4 x 1,8-2,25 μm . Conidios producidos sobre pequeños denticulos en la zona superior del conidióforo, forma cilíndrica con ligeras constricciones en los 2-3 septos que presentan, con parte del denticulo del conidióforo unido a la base, ligeramente apiculada, superficie de verrucosa a tuberculada de acuerdo con la observaciones en el microscopio electrónico de barrido, color oliva pálido-marrón oliváceo, tamaño de 11,2-14,1 x (2,8-)3,5(-4,2) μm . Clamidosporas ausentes (Figs. 16d-h y 17)

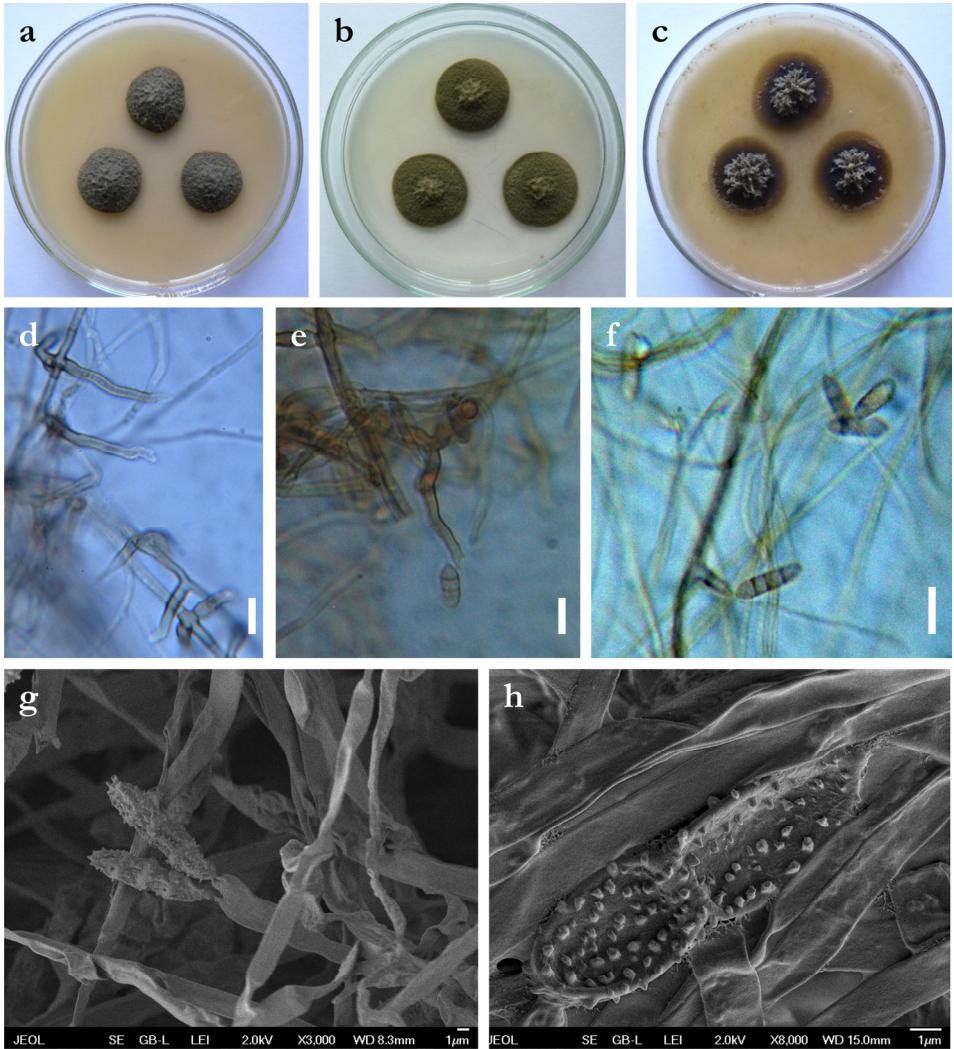
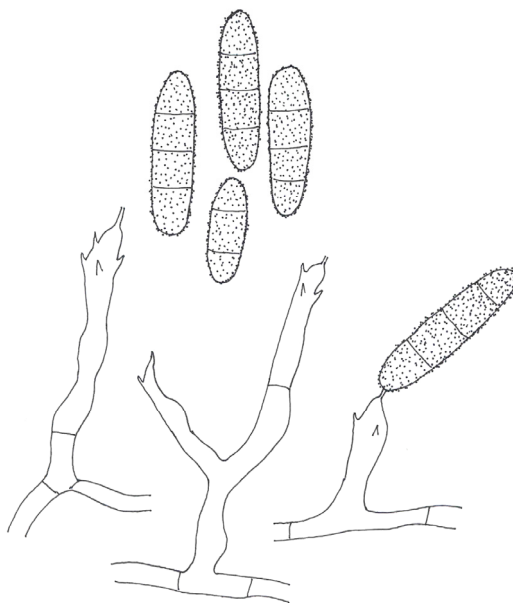


Figura 16. *Ochroconis lascauxensis*, cepa LX A1 (holotipo). Colonias tras 10 días de incubación a 25°C sobre MEA (a), PDA (b) y V8A (c). Conidióforos y conidios observados por microscopía óptica (d-f; barra de escala: 10 µm) y microscopía electrónica de barrido (g y h; barra de escala: 1 µm).

Figura 17. Características microscópicas de *Ochroconis lascauxensis*. Conidióforos y conidios.



Holotipo: LX A1 (=CMF ISB 1862), aislado por Fabiola Bastian de una muestra de mancha negra sobre la roca caliza, recogida el 26 de agosto de 2008, de la pared izquierda del Pasaje de la cueva de Lascaux, Montignac, Francia (45° 3' 13.3" N, 1° 10' 12" E).

Hábitat: Paredes, bóvedas, sedimentos y aire de la cueva de Lascaux, frecuentemente asociado a las manchas negras desarrolladas en superficie.

Material examinado:

Cepas aisladas de la cueva de Lascaux: LX CH2, LX CH3, LX CH7, LX CH13, LXCH16, LX A1, LX A3, LX 101R-6 y LX 101R-7.

Cepas de referencia: *O. tsbanytschae* CBS 100438 y *O. anellii* CBS 284.64.

Ochroconis anomala A. Nováková y P.M. Martin-Sanchez, sp. nov.

Código Mycobank: MB561939

Etimología: el epíteto específico es el adjetivo que hace referencia a la conidiogénesis anómala que desarrolla esta especie, distinta de la típica del género *Ochroconis*.

Descripción en latín:

Coloniae in MEA, ad 25°C, 17-22 mm in diametro post 14 dies, planae, velutinae ad floccosae in partis centralis, colonia margin tincto 1,5 mm, olea viridae cum olivaceo-cinereus in partis centralis, reversum olivaceo-viride nigricans. Coloniae in PDA 20-22 mm, planae cum 2-2.5 mm margo submerse, reversum olivaceo-viride nigricans. Hyphae subhyalinae ad pallide brunnae, conidiophorae erectae aut flexuosae, dilucide olivaceo-viridae cum terminae hyalinae, glabrae, 12,6-25,2 \times 2,8-3,6 μ m. Conidiogenesis duo modi – conidia penetretibus ad partis apical in catella breve et sequentia in denticulis, conidia pallide olivacea, 2-5- cellularia, majorem partem 1-2-septata, 1-septata 7,8 \times 2,4 μ m, 2-septata 10,2-12,0 \times 3,6 μ m, 3-septata 12,0-12,6 \times 3,6 μ m, \pm glabra, in microscopo SEM rugosa neque verrucosa aut echinata. Chlamydosporae absentae.

Descripción:

Colonias crecidas durante 14 días sobre MEA a 25°C con diámetros comprendidos entre 17 y 22 mm, aspecto plano con abultamiento central, superficie velutinosa, con margen sumergido 1,5 mm, de color gris oliva con la zona central oliva grisáceo en el anverso y verde oliva profundo al reverso. Las colonias crecidas sobre PDA tuvieron unos diámetros comprendidos entre 20 y 22 mm, aspecto plano, superficie velutinosa, con margen sumergido 2-2,5 mm, de color verde oliva grisáceo en el anverso y verde oliva oscuro en el reverso. Las colonias crecidas sobre V8A tuvieron unos diámetros comprendidos entre 17 y 19 mm, aspecto plano, superficie velutinosa con la zona central granular, con el margen sumergido 2 mm, de color verde oliva grisáceo en el anverso y verde oliva oscuro en el reverso (Fig. 18a-c).

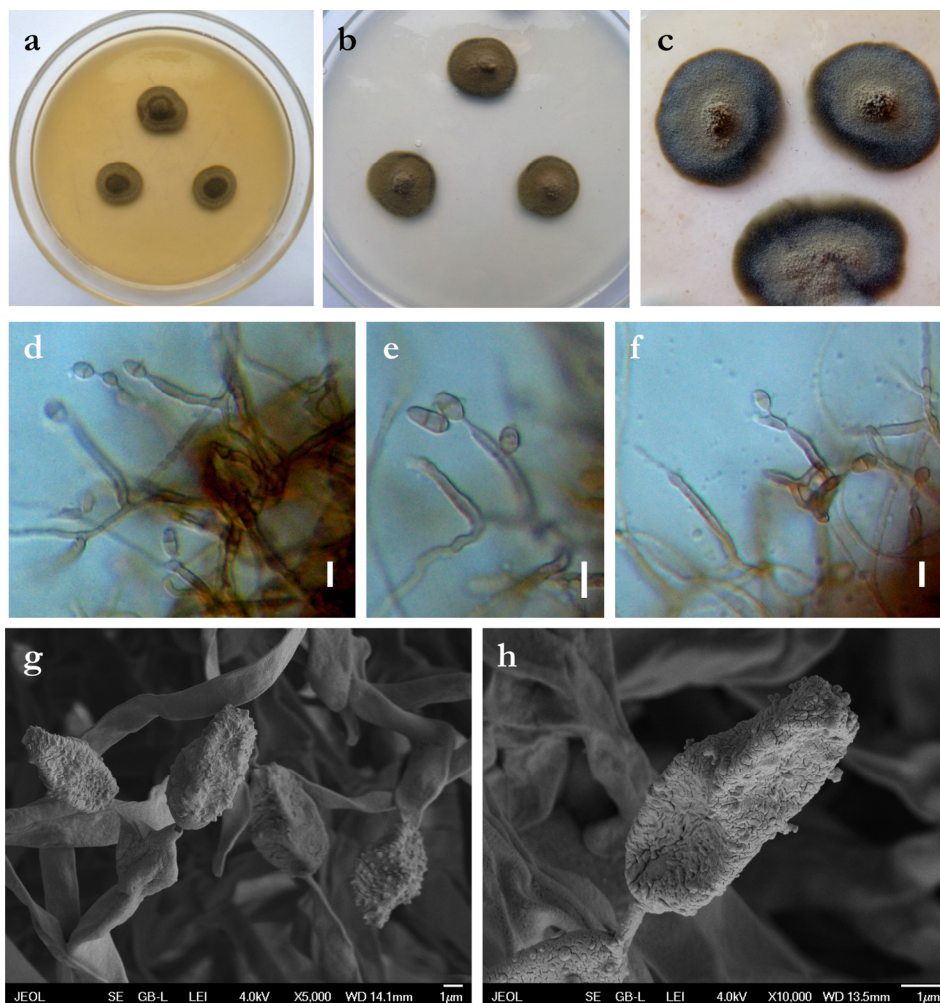


Figura 18. *Ocbroconis anomala*. Colonias tras 10 días de incubación a 25°C sobre MEA (a), PDA (b), y tras un mes sobre V8A (c). Conidióforos y conidios observados por microscopía óptica (d-f; barra de escala: 10 µm) y microscopía electrónica de barrido (g y h; barra de escala: 1 µm).

Hifas subhialinas de color pardo. Conidióforos rectos o flexuosos, con forma cilíndrica, simples o ramificados, presentan 0-2 septos, superficie lisa, de color oliva pálido, disminuyendo en la zona superior hialina, tamaño de 12,6-25,2 x 2,8-3,6 µm. Muestra dos tipos de conidiogénesis, en una de ellas los conidios proliferan desde la zona apical de la célula conidiógena

formando cadenas cortas (conidiogénesis anómala), en el otro tipo los conidios se producen sobre denticulos en la zona superior del conidióforo (conidiogénesis frecuente en el género *Ochroconis*). Conidios con forma cilíndrica, con 2-4 septos predominando aquellos que tienen 2, con superficie aproximadamente lisa al microscopio óptico, pero de aspecto áspero de acuerdo con la observaciones en el microscopio electrónico de barrido, tamaño variable según el número de células que la formen, con 2 células $7,8 \times 2,4 \mu\text{m}$, con 4 células $10,2\text{-}12 \times 3,6 \mu\text{m}$ y con 5 células $12\text{-}12,6 \times 3,6 \mu\text{m}$. Clamidosporas ausentes (Figs. 18d-h y 19).

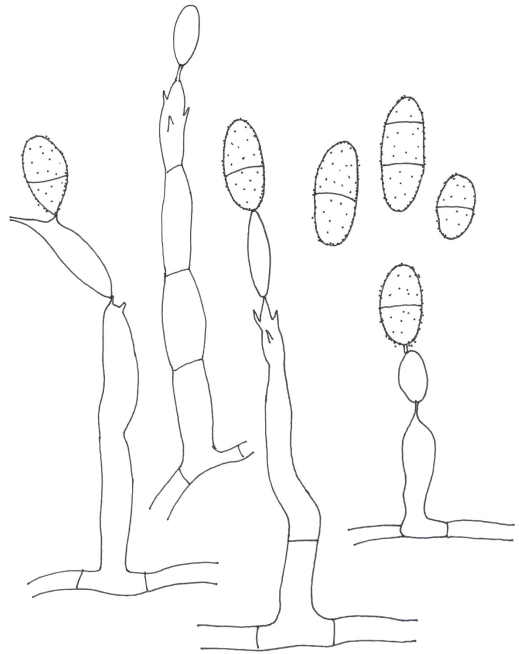


Figura 19. Características microscópicas de *Ochroconis anomala*. Conidióforos y conidios.

Holotipo: LX CH40 (=CMF ISB 1866), aislado por Fabiola Bastian de una muestra de colonización fúngica blanca sobre el sustrato arcilloso, recogida el 23 de agosto de 2007, de la pared derecha a la entrada del Divertículo Axial de la cueva de Lascaux, Montignac, Francia ($45^{\circ} 3' 13.3''$ N, $1^{\circ} 10' 12''$ E).

Hábitat: Paredes de la cueva de Lascaux, asociado a colonizaciones fúngicas y manchas negras.

Material examinado:

Cepas aisladas de la cueva de Lascaux: LX CH40 y LX M1-3.

Cepas de referencia: *O. tshanytschae* CBS 100438 y *O. anellii* CBS 284.64.

En cuanto al tipo de conidiogénesis y morfología de los conidios, las dos nuevas especies descritas pertenecen al género *Ochroconis*. El género *Scolecobasidium* está restringido a aquellas especies que desarrollan conidios trilobulados (de Hoog y von Arx 1973). Los conidios de *O. lascauxensis* tienen mayoritariamente 2-3 septos mientras que *O. anomala* tan sólo uno. Su forma es más cilíndrica en *O. lascauxensis*, y su superficie se muestra diferente al observarse con el microscopio electrónico de barrido, con tubérculos en *O. lascauxensis* y aspecto rugoso en *O. anomala*.

Las especies más próximas a las aisladas en la cueva de Lascaux son *O. tshanytschae* (Doty et Slater) Kirilenko & Al-Akhmed 1977, y *O. anellii* (Graniti) de Hoog & Arx 1973. Estas dos especies desarrollan conidios similares, principalmente con dos septos y superficie tuberculada (Fig. 20). Sin embargo, éstas dos especies tipo desarrollan conidios que alcanzan una mayor longitud que las especies aisladas de la cueva de Lascaux. Los conidios de *O. tshanytschae* presentan una forma más cilíndrica, y los de *O. anellii* son más elípticos, con una mayor anchura (4-7,5 μm). Además *O. anellii* desarrolla conidióforos más robustos.

En este estudio se incluyó la cepa LX PDA, identificada como *Ulocladium* sp. por el LRMH, años antes, y a la que atribuyeron la formación de las manchas negras. Esta era representativa de las abundantes colonias melanizadas aisladas de las manchas negras que aparecieron sobre la roca caliza: en la cornamenta del Ciervo Abatido del Ábside (agosto de 2007, Fig. 7d), y en las zonas A-D del Pasaje, utilizadas en el ensayo de los tratamientos de control (agosto de 2008-febrero de 2009, Fig. 7f,g) (Oriol y Mertz 2006, Oriol y col. 2011). Tras su análisis, la cepa LX-PDA se identificó como *O. lascauxensis*, poniendo de manifiesto que su anterior identificación fue claramente errónea. El género *Ulocladium*, aunque puede desarrollar colonias con morfología algo similar a las de *Ochroconis*, posee

características microscópicas y posición filogenética muy diferente (Barron 1968, de Hoog y col. 2000, Domsch y col. 2007). *Ulocladium* pertenece a la familia Pleosporaceae, muy distante filogenéticamente de *Ochroconis*, sus conidios son ovoides en lugar de cilíndricos como *O. lascauxensis*, irregularmente divididos con septos transversales, oblicuos y longitudinales, mientras que *O. lascauxensis* sólo presenta septos transversales. Por sus características microscópicas, el género *Ulocladium* podría confundirse con *Alternaria*, pero en ningún caso con *Ochroconis* (Barron 1968).

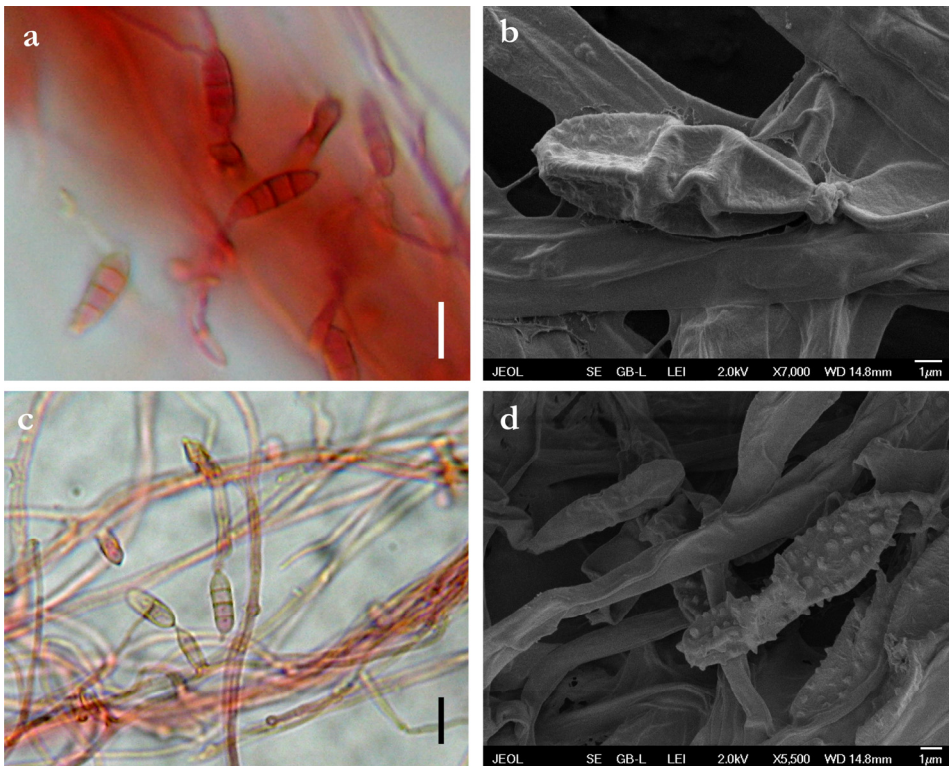


Figura 20. Comparativa entre conidióforos y conidios de *Ochroconis anelli* CBS 284.64 (a y b) y *O. tschanytschae* CBS 100438 (c y d). Barras de escala: 10 µm (microscopía óptica) y 1 µm (microscopía electrónica de barrido).

La especie *O. lascauxensis*, en función de sus características morfológicas y de los resultados moleculares iniciales, análisis BLAST de sus secuencias ITS, puede llegar a confundirse con *S. tsbanytschae* (sinónimo de *O. tsbanytschae*), como ocurrió en los primeros estudios llevados a cabo por Bastian y col. (2010). Sin embargo, en el presente estudio, los análisis filogenéticos y el estudio comparativo de sus caracteres morfológicos, incluyendo el análisis SEM, permitieron diferenciar las dos nuevas especies aisladas de la cueva de Lascaux de las especies más próximas, *O. tsbanytschae* y *O. anellii*.

De acuerdo con Domsch y col. (2007), *S. tsbanytschae* (= *O. tsbanytschae*) es la segunda especie más común del género *Scolecobasidium*, y ha sido aislada a partir de sustratos muy variados: suelo, turba, hojarasca, rizosfera, acículas de pino, invernaderos tropicales, compost, aguas de acuarios, marismas, etc. (Roy y col. 1962, de Hoog y col. 2000, Grandi y Gusmão 2002, Orłowska y col. 2004, Liu y Zhang 2004, Piontelli y col. 2005, Domsch y col. 2007). Pinholt y col. (1979) asoció esta especie a suelos enriquecidos con petróleo, demostrando su capacidad de asimilar hidrocarburos. Recientemente ha sido descrita como patógeno humano causando feohifomicosis subcutánea (Ge y col. 2012). Esta especie también ha sido aislada del aire de la cueva Domica, Eslovaquia (Nováková 2009). La especie *O. anellii* fue inicialmente descrita en manchas negras desarrolladas sobre las estalactitas de la cueva de Castellana, Bari, Italia (Graniti 1963), y también ha sido aislada del sedimento de la cueva Javoříčko, República Checa (Bosák y col. 2001), y de muestras de suelo procedentes de la Cordillera Dahingganling, Mongolia, China (Wu y Zhang 2008).

La abundancia de las especies de *Ochroconis* en la cueva de Lascaux fue muy diferente, *O. lascauxensis* se encontró ampliamente distribuida (28 de las 30 cepas estudiadas), mientras que la presencia de *O. anomala* fue bastante restringida, ya que sólo se aislaron dos cepas. *O. lascauxensis* estuvo principalmente asociada a las manchas negras que aparecen sobre la roca caliza de las paredes y bóvedas, 19 de las 28 cepas analizadas se aislaron de

este tipo de sustrato (Tabla 2). Sin embargo, su distribución parece ser mucho más amplia, aislándose también de manchas con distinta coloración que cubren los sedimentos arcillosos de los bancos laterales, e incluso de muestras de aire. Actualmente no tenemos datos suficientes para determinar la distribución de *O. anomala*; LX CH40 se aisló de una colonización fúngica del Divertículo Axial y LX M1-3 de una mancha negra sobre un banco arcilloso del Pasaje.

Caracterización de especies de *Ochroconis*

Crecimiento a distintas temperaturas

Las tasas de crecimiento a distintas temperaturas de las dos cepas ensayadas de *O. lascauxensis* se muestran en la Tabla 5. La temperatura óptima de crecimiento para ambas cepas fue de 22°C (Fig. 21a), con tasas de crecimiento en medio MEA de $38,5 \pm 1,5$ mm/mes (LXA1) y $39,7 \pm 0,2$ (LXCH16). Por debajo de esta temperatura, las colonias tuvieron un crecimiento considerable a los 13°C (temperatura media de la cueva), que disminuyó notablemente a los 5°C (Fig. 21b), con valores en torno a los 8 mm/mes. A las temperaturas superiores ensayadas (30 y 35°C) ninguna de las cepas fue capaz de crecer.

Tabla 5. Tasas de crecimiento de *O. lascauxensis* a diferentes temperaturas, expresadas (mm/mes)

Cepas	5°C	13°C	22°C	30°C	35°C
LX A1	$8,2 \pm 0,2$	$22,7 \pm 0,7$	$38,5 \pm 1,5$	-	-
LX CH16	$9,7 \pm 0,5$	$25,2 \pm 1,7$	$39,7 \pm 0,2$	-	-

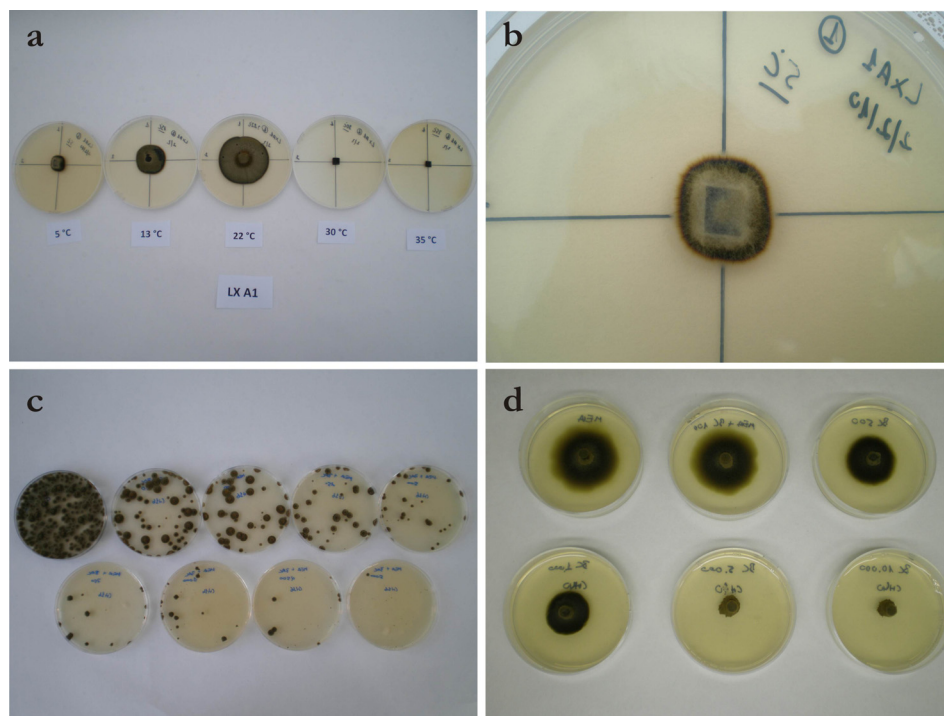


Figura 21. **a.** Ensayo de crecimiento a distintas temperaturas de colonias de la cepa LX A1 crecidas en MEA durante un mes. **b.** Detalle de la colonia desarrollada a 5°C. **c, d.** Ensayos de tolerancia al cloruro de benzalconio. **c.** Suspensión micelial de la cepa LX CH16 crecida durante 10 días en MEA con distintas concentraciones de BC (0, 50, 100, 250, 500, 750, 1.000, 2.500 y 5.000 mg/l). **d.** Colonias de la cepa LX CH40 crecidas durante un mes en MEA con diferentes concentraciones de BC (0, 100, 500, 1.000, 5.000 y 10.000 mg/l).

Tolerancia al cloruro de benzalconio

Los resultados fueron idénticos para los dos cepas de *O. lascauxensis* (LX A1 y LX CH16); todas las concentraciones ensayadas de cloruro de benzalconio (BC) tuvieron un claro efecto inhibitor, pudiendo establecerse distintos grados de inhibición (Fig. 21c), 50% con 50 y 100 mg/l, 75% con 250 y 500 mg/l, 90% con 750 y 1.000 mg/l, 95% con 2.500 mg/l, 99% con 5.000 mg/l, y del 100%, es decir crecimiento nulo, entre 7.500 y 12.500 mg/l.

Del mismo modo, la cepa LX CH40 de *O. anomala*, disminuyó su tasa de crecimiento conforme aumentaban las concentraciones de BC (Fig. 21d). La tasa de crecimiento a 22°C en el control (sin BC) fue de $29 \pm 0,4$ mm/mes, la cual disminuye ligeramente a concentraciones de BC de 100 y 500 mg/l ($28,2 \pm 0,5$ y $21 \pm 0,4$ mm/mes, respectivamente); mostró un efecto inhibitor más acusado a BC 1.000 mg/l ($14,7 \pm 0,5$ mm/mes), y casi total a BC 5.000 y 10.000 mg/l ($5 \pm 0,4$ y $1,7 \pm 0,5$ mm/mes, respectivamente).

Perfil de ácidos grasos

Los perfiles de ácidos grasos de las trece cepas caracterizadas se muestran en las Tablas 6 y 7. Todas las cepas presentaron los mismos cuatro ácidos grasos mayoritarios, 18:0 *anteiso* / 18:2 ω 6,9c (agrupados debido a sus tiempos de retención similares), 16:0 (palmítico), 18:1 ω 9c (oleico) y 18:0 (esteárico). Sin embargo, los diferentes porcentajes que mostraron las distintas cepas fueron característicos de la especie a la que pertenecen, como corrobora el análisis de componentes principales de estos perfiles (Fig. 22). Las siete cepas estudiadas de *O. lascauxensis* tuvieron un perfil de ácidos grasos similar, que se diferencia de cuatro de las cinco especies de referencia, excepto *O. humicola* CBS 116655. La cepa LX CH40 tuvo un perfil distinto del resto, lo que apoya la idea de que esta cepa pertenece a otra nueva especie, *O. anomala*.

Los resultados obtenidos en el análisis de los ácidos grasos también apoyaron la separación de las cepas de la cueva de Lascaux formando dos especies independientes. Lanoiselet y col. (2005) aplicó igualmente esta metodología para diferenciar especies del género *Rhizoctonia*.

Tabla 6. Ácidos grasos mayoritarios (> 1%) de las cepas de *Ochroconis* aisladas de la cueva de Lascaux.

Ácidos grasos	Porcentajes medios (%) ^a							
	<i>Ochroconis lascauxensis</i>							<i>O. anomala</i>
	LX CH3	LX CH7	LX CH16	LX 7.2	LX A1	LX A3	LX 101R-6	LX CH40
18:0 <i>anteiso</i> / 18:2 ω6,9c	35,4	33,1	37,1	31,2	39,2	36,5	34,7	33,9
16:0	30,3	34,2	30,0	31,8	25,8	33,0	30,9	23,1
18:1 ω9c	23,5	21,7	21,6	25,8	25,1	19,9	25,6	34,9
18:0	9,4	9,6	10,1	10,0	7,3	9,2	6,1	5,3

^a: Valores medios de tres réplicas, los valores máximos para cada cepa aparecen en negrita.

Tabla 7. Ácidos grasos mayoritarios (> 1%) de las cepas de referencia de *Ochroconis* y *Scolecobasidium*.

Ácidos grasos	Porcentajes medios (%) ^a				
	<i>O. tschanyschae</i> CBS100.438	<i>O. anellii</i> CBS284.64	<i>O. constricta</i> CBS211.54	<i>O. humicola</i> CBS116655	<i>S. terreum</i> CBS536.69
18:0 <i>anteiso</i> / 18:2 ω6,9c	56,39	53.10	20.78	35.03	28.63
16:0	13,79	19.79	32.24	29.44	30.18
18:1 ω9c	18,42	20.54	36.17	26.43	35.97
18:0	8,40	6.24	8.74	4.98	
18:3 ω6c (6,9,12)	3,50				
16:1 ω7c / 15 <i>iso</i> 2OH				1.13	2.37
18:1 ω7c					1.44

^a: Valores medios de tres réplicas, en negrita los valores máximos para cada cepa.

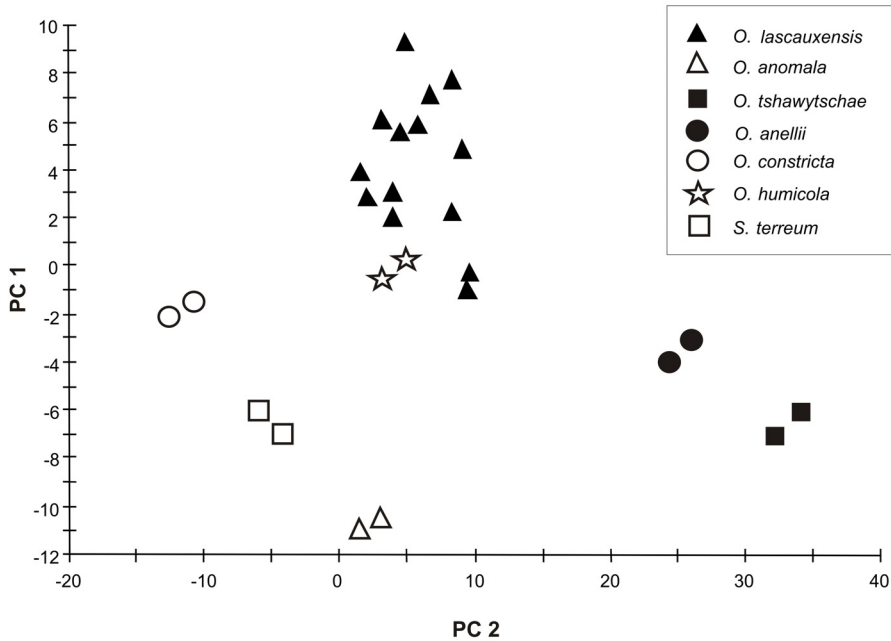


Figura 22. Análisis de componentes principales de los perfiles de ácidos grasos de la especies de *Ochroconis-Scolecobasidium*. Se analizaron siete cepas de *O. lascauxensis* (LX A1, LX A3, LX CH3, LX CH7, LX CH16, LX 7.2 y LX 101R-6), una de *O. anomala* (LX CH40), y las cinco cepas de referencia pertenecientes a otras especies. Se muestran dos de las tres réplicas analizadas para cada cepa.

Fuentes de carbono

Es importante caracterizar la ecología de las especies *Ochroconis*, ya que su presencia y abundancia en la cueva debe estar relacionada con la disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno. Las cuevas por lo general son ambientes oligotrofos donde la disponibilidad de fuentes nutricionales son factores críticos para el crecimiento microbiano.

Las dos nuevas especies de *Ochroconis* aisladas de la cueva de Lascaux mostraron un amplio rango de fuentes de carbono asimilables (Tabla 8), ya que 58 de los 95 compuestos evaluados con el sistema Biolog (61% de las

fuentes de carbono) dieron reacciones positivas para *O. lascauxensis*, y 56 de 95 (58%) para *O. anomala*, siendo 55 de ellos comunes para ambas especies. Numerosos azúcares (mono-, di- y polisacáridos), glucósidos, ácidos y aminoácidos pueden ser metabolizados por estas especies. Las cuatro cepas de *O. lascauxensis* (LX A1, LX CH7, LX 7.2 y LX 101R-6) mostraron resultados similares exceptuando los obtenidos con algunas fuentes de carbono puntuales (L-fucosa, ácido D-sacárico y ácido L-pirrolutámico). Estos resultados pueden explicar la instalación de estas especies en la cueva, y la abundante distribución de *O. lascauxensis*.

Al comparar estos resultados con los obtenidos para las otras especies de *Ochroconis* y *Scolecobasidium* (Tabla 9), hay que destacar que todas las especies analizadas tuvieron idénticos resultados frente a 49 de los compuestos evaluados. Las 46 fuentes de carbono restantes tuvieron distintos resultados según la especie analizada. La especie *O. lascauxensis* se diferencia del resto en su capacidad de metabolizar el ácido D-glucurónico, y *O. anomala* es la única especie capaz de asimilar el ácido γ -hidroxibutírico y el azúcar L-fucosa (también asimilado por la cepa LX 101R-6 de *O. lascauxensis*). Ambas especies de la cueva de Lascaux y *O. tsbanytschae* tienen en común la capacidad exclusiva de utilizar el azúcar D-arabinosa y el ácido sebácico. Las especies *O. constricta* y *S. terreum* tienen en común que son las únicas capaces de metabolizar los siguientes compuestos: ácido D-glucónico, α -metil D-galactosidasa, L-treonina, 2-amino-etanol y putrescina. La especie *O. anellii* es la que menos fuentes de carbono es capaz de utilizar (48 de 95), hay ocho compuestos que son asimilados por el resto de especies mientras que *O. anellii* es incapaz de hacerlo.

Tabla 8. Listado de compuestos utilizados como fuentes de carbono por especies de *Ochroconis* de la cueva de Lascaux.

Mono- sacáridos	Di- sacáridos	Tri- y poli- sacáridos	Glucósidos	Ácidos	Aminoácidos	Otros
D-Galactosa	Turanosa	D-Rafinosa	Salicina	Ácido γ -amino-butírico	L-Alanina	Tween 80
α -D-Glucosa	Maltosa	Maltotriosa	Amigdalina	Ácido quínico	L-Asparagina	
L-Rhamnosa	D-Trehalosa	D-Melezitosa	Arbutina	Ácido fumárico	L-Fenilalanina	
D-Ribosa	D-Melibiosa	Estachiosa		Ácido L-málico	Ácido L-glutámico	
D-Xylosa	Palatinosa	Dextrina		Ácido succínico	Ácido L-aspártico	
D-Manosa	Sacarosa			Ácido D-málico	L-Prolina	
D-Fructosa	D-Celobiosa			Ácido α -ceto-glutárico	L-Ornitina	
L-Arabinosa	Gentibiosa			Ácido β -hidroxi-butírico	L-Alanil-glicina	
α -D-Lactosa				Ácido γ -hidroxi-butírico ^b	Putrescina ^a	
L-Fucosa				Ácido sebácico	Ácido glicil-L-glutámico	
D-Arabinosa				Ácido L-láctico		
Glucosa-1-fosfato				Ácido succinámico ^a	L-Serina	
β -Metil-D-glucósido				Ácido bromosuccínico	Alaninamida	
				Ácido D-glucurónico ^a	Ácido L-pirolglutámico	
				Ácido D-sacárico		
				Ácido p-hidroxifenil-acético		

^a: Fuentes de carbono utilizadas únicamente por *O. lascauxensis* (LX A1, LX CH7, LX 7.2 y LX 101R-6).

^b: Fuente de carbono utilizada únicamente por *O. anomala* (LX CH40).

Tabla 9. Fuentes de carbono de las distintas especies de *Ochroconis* y *Scolecobasidium*. Resultados obtenidos con el sistema Biolog (FF MicroPlate).

Fuentes carbono	<i>Ol</i> ^a	<i>Oa</i>	<i>Ot</i>	<i>Oan</i>	<i>Oc</i>	<i>Ob</i>	<i>St</i>
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetil-D- galactosamina	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetil-D- glucosamina	+	+	+	+	+	+	+
N-Acetil-D- manosamina	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	+	+	+	-	+	+	+
Amigdalina	+	+	+	+	+	+	-
D-Arabinosa	+	+	+	-	-	-	-
L-Arabinosa	+	+	+	-	+	+	+
D-Arabitól	+	+	+	+	+	-	+
Arbutina	+	+	+	-	+	+	+
D-Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+
α -Cyclodextrina	-	-	-	-	-	-	-
β -Cyclodextrina	-	-	-	-	-	-	-
Dextrina	+	+	+	+	+	+	+
i-Eritritol	-	-	-	+	+	-	-
D-Fructosa	+	+	+	+	+	+	+
L-Fucosa	+ ^b	+	-	-	-	-	-
D-Galactosa	+	+	+	-	+	+	+
Ácido D-galacturónico	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiosa	+	+	+	+	+	+	+
Ácido D-glucónico	-	-	-	-	+	-	+
D-Glucosamina	-	-	-	-	-	-	-
α -D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa-1-fosfato	+	+	+	+	+	+	+
Glucuronamida	-	-	-	-	-	-	-
Ácido D- glucurónico	+	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+
Glicógeno	-	-	-	-	-	-	-
m-Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Ácido 2-ceto- D-glucónico	-	-	-	-	-	-	-
α -D-Lactosa	+	+	+	-	+	+	+
Lactulosa	-	-	-	-	+	+	-

Tabla 9 (Continuación).

Fuentes carbón	<i>Ol</i> ^a	<i>Oa</i>	<i>Ot</i>	<i>Oan</i>	<i>Oc</i>	<i>Ob</i>	<i>St</i>
Maltitol	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+
Maltotriosa	+	+	+	+	+	+	+
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+
D-Manosa	+	+	+	+	+	+	+
D-Melezitosa	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiosa	+	+	+	-	+	-	+
α -Metil-D-galactosidasa	-	-	-	-	+	-	+
β - Metil-D-galactosidasa	-	-	-	-	+	-	-
α - Metil-D-glucósido	-	-	-	-	-	-	-
β - Metil-D-glucósido	+	+	+	+	+	+	-
Palatinosa	+	+	+	+	+	+	+
D-Psicosa	-	-	-	-	-	-	-
D-Rafinosa	+	+	+	+	+	-	+
L-Ramnosa	+	+	+	-	+	+	+
D-Ribosa	+	+	-	+	+	-	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	-
Sedoheptulosa	-	-	-	-	+	-	-
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbosa	-	-	-	-	-	-	-
Estachiosa	+	+	+	+	+	-	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+
D-Tagotosa	-	-	-	-	-	-	+
D-Trehalosa	+	+	+	+	+	+	+
Turanosa	+	+	+	+	+	+	+
Xilitol	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilosa	+	+	+	+	+	+	+
Ácido γ -amino-butírico	+	+	-	-	+	+	+
Ácido bromosuccínico	+	+	-	+	+	+	+
Ácido fumárico	+	+	+	+	+	-	+
Ácido β -Hidroxi-butírico	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 9 (Continuación).

Fuentes	<i>Ol</i> ^a	<i>Oa</i>	<i>Ot</i>	<i>Oan</i>	<i>Oc</i>	<i>Ob</i>	<i>St</i>
carbono							
Ácido γ -hidroxi-butírico	-	+	-	-	-	-	-
Ácido p-hidroxifenil-acético	+	+	-	-	+	+	+
Ácido α -ceto-glutárico	+	+	-	+	+	+	+
Ácido metil ester D-láctico	-	-	-	-	-	-	+
Ácido L-láctico	+	+	-	+	+	+	+
Ácido D-málico	+	+	+	-	+	-	+
Ácido L-málico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido quínico	+	+	+	-	+	+	+
Ácido D-sacárico	+ ^c	+	+	+	+	-	-
Ácido sebácico	+	+	+	-	-	-	-
Ácido succinámico	+	-	-	-	+	-	+
Ácido succínico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido mono-metil ester succínico	-	-	-	-	-	-	-
Ácido N-acetil-L-glutámico	-	-	-	-	+	+	+
Alaninamida	+	+	-	-	+	+	+
L-Alanina	+	+	+	+	+	+	+
L-Alanil-glicina	+	+	+	+	+	-	+
L-Asparagina	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-aspartico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-glutámico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido glicil-L-glutámico	+	+	+	+	+	-	-
L-Ornitina	+	+	-	+	+	+	+
L-Fenilalanina	+	+	+	+	+	+	+
L-Prolina	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-piroglutámico	+ ^c	+	+	-	+	+	+
L-Serina	+	+	+	+	+	+	+
L-Treonina	-	-	-	-	+	-	+
2-Amino etanol	-	-	-	-	+	-	+
Putrescina	+	-	-	-	+	-	+
Adenosina	-	-	-	-	-	-	-
Uridina	-	-	-	-	+	-	-
Adenosina-5'-monofosfato	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 9 (Continuación).

Abreviaturas: *Ol*: *O. lascauxensis*; *Oa*: *O. anomala*; *Ot*: *O. tsbanytschae*; *Oan*: *O. anellii*; *Oc*: *O. constricta*; *Ob*: *O. humicola*; *St*: *S. terreum*.

Las casillas sombreadas indican resultados diferentes entre las cepas estudiadas.

^a: Resultado basado en el análisis de cuatro cepas: LX A1, LX CH7, LX 7.2 y LX 101R6

^b: Resultado positivo solo en la cepa LX 101R6

^c: Resultado positivos en la cepas: LX A1, LX CH7 y LX 7.2

Cloruro de benzalconio y sus productos de degradación como fuentes de carbono

Se evaluó la capacidad de *O. lascauxensis* LX CH16 de utilizar como fuente de carbono el BC o algunos de sus productos de degradación. Los resultados de este ensayo se detallan en la Figura 23. Las distintas concentraciones evaluadas de BC y BDAM no mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo, el cual presenta un incremento de biomasa de $10,5 \pm 1.08$ mg debido a las reservas nutricionales que mantiene el micelio inoculado. Sin embargo, los subproductos BAM y BNa muestran un incremento de biomasa significativamente superior al control negativo. Los incrementos detectados con estos productos (en torno a 13-15 mg) pueden parecer muy débiles en relación con el incremento de biomasa producido en el control positivo (sacarosa), $87,25 \pm 1.05$ mg (no se muestra en el gráfico), pero hay que tener en cuenta que la concentración testada de éstos compuestos es muy baja (aprox. 50-100 µl/l del producto puro) en relación con la cantidad de sacarosa que contiene el control positivo (30g/l). Si se calculan las concentraciones necesarias de estos productos para que aporten la misma cantidad de carbono que esa cantidad de sacarosa (12,6 g/l de carbono), las concentraciones de BDAM, BAM y BNa deben ser unas 200 veces superiores (aprox. 16-17-30 ml/l, respectivamente). Se intentó repetir el ensayo con estas condiciones, pero no fue posible metodológicamente pues estos compuestos no son solubles a concentraciones tan elevadas, además de que su toxicidad es desconocida. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se estableció que los resultados obtenidos fueron válidos

para demostrar que *O. lascauxensis* es capaz de utilizar como fuente de carbono la benzilamina (BAM) y el ácido benzoico (BA).

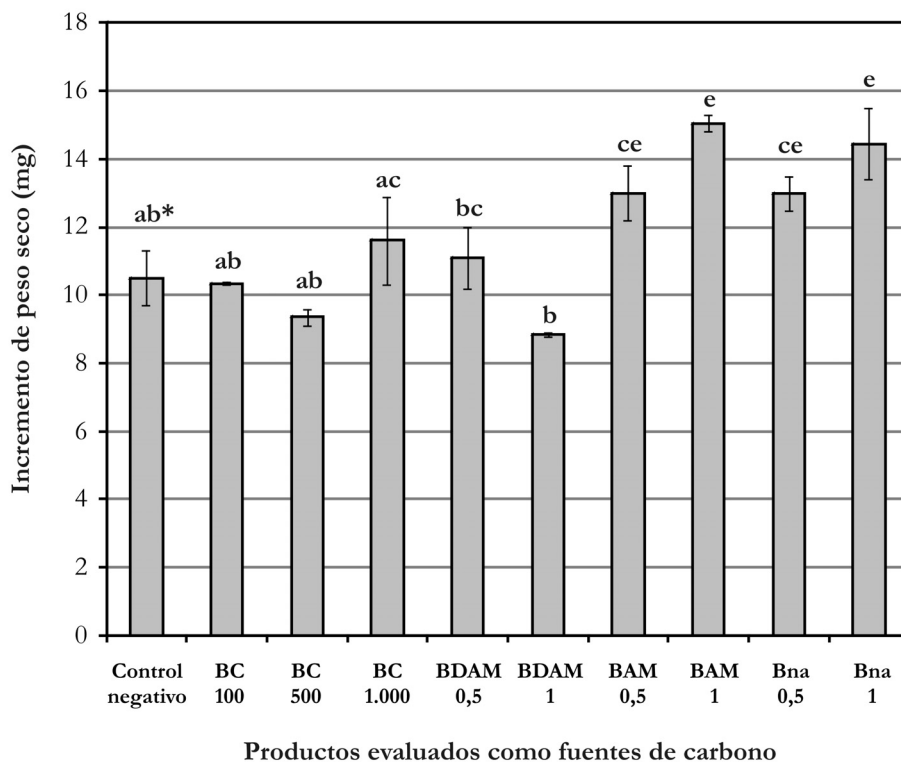


Figura 23. Utilización de fuentes de carbono por *Ocrobionis lascauxensis* LXCH16. Los datos son medias de dos replicas.

(*) Los valores acompañados por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con el Test de Fisher ($P=0,05$).

Fuentes de nitrógeno

Se caracterizaron las fuentes de nitrógeno asimilables por *O. lascauxensis* LX CH16. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 24, en la que se detallan los incrementos de biomasa ya relativizados, restando el incremento medio producido en el control negativo. Se observó que todos los productos ensayados se utilizaron como fuentes de nitrógeno

por este hongo. Las fuentes de nitrato (NaNO_3) y amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ son las que asimiló con mayor eficiencia, mientras que la fuente de nitrito (NaNO_2), y los subproductos del cloruro de benzalconio BDAM y BAM, produjeron un incremento de biomasa significativamente inferior. Sin embargo, estos tres productos fueron claramente utilizados como fuente de nitrógeno, provocando el doble de incremento biomasa que el control negativo.

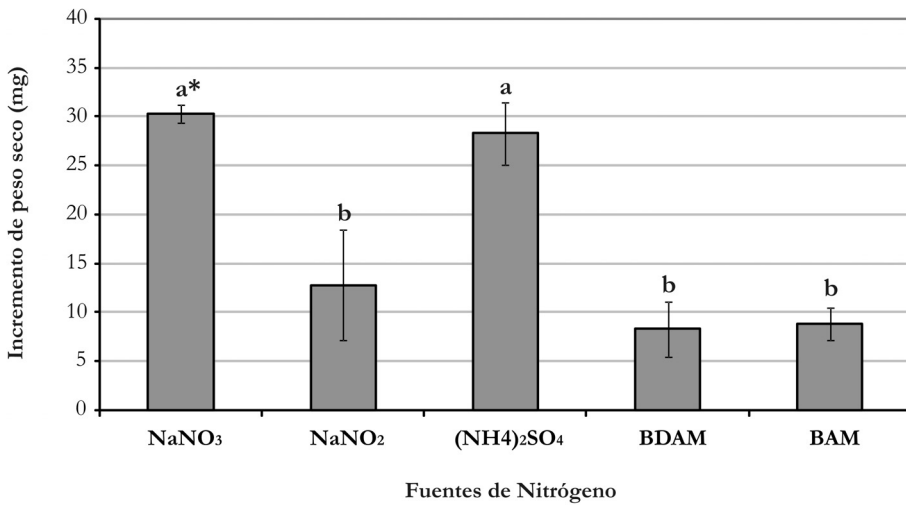


Figura 24. Utilización de fuentes de nitrógeno por *Ochroconis lascauxensis* LXCH16. Los datos son medias de tres replicas, relativizadas con el valor medio obtenido en el control negativo (solución Czapek sin nitrógeno).

(*) Los valores acompañados por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con el Test de Fisher ($P=0,05$).

Los resultados obtenidos en estos ensayos demuestran que los tres productos de degradación del cloruro de benzalconio, BDAM, BAM y BA, aportan carbono o nitrógeno asimilable por *O. lascauxensis*.

La influencia de los tratamientos biocidas en el origen y evolución de las especies de *Ochroconis* se discute en el capítulo 4, junto con otras especies

de hongos que se encontraron asociadas al fenómeno de las manchas negras.

Lastennet y col. (2011) encontraron abundantes sales nitrogenadas en los sedimentos y aguas de goteo de la cueva, lo que indica la amplia disponibilidad de fuentes de nitrógeno que tienen estos hongos para el desarrollo de su metabolismo.

Enzimas degradativas

Se caracterizaron las enzimas degradativas presentes en ocho cepas de *O. lascauxensis*, una cepa de *O. anomala*, y las cinco cepas de referencia del CBS (Tabla 10). Todas las cepas ensayadas producen cinco de las 19 enzimas evaluadas con el sistema Apy Zym: fosfatasa alcalina, esterasa (C4), leucina arilamidasa, fosfatasa ácida y naftol-AS-BI-fosfohidrolasa. Además, algunas de las cepas aisladas de la cueva de Lascaux tienen la actividad esterasa lipasa (C8) y α -galactosidasa. Por lo demás, las actividades enzimáticas de las cepas de la cueva son bastante homogéneas, sólo muestran leves diferencias en cuanto a la cantidad de sustrato hidrolizado. Las especies *O. humicola* y *S. terreum* poseen algunas actividades enzimáticas que las diferencian del resto.

Tabla 10. Actividades enzimáticas detectadas en especies de *Ochroconis-Scolecobasidium*, resultados del sistema Api Zym expresados en cantidad de sustrato hidrolizado^a.

Enzimas ensayadas ^b	<i>Ochroconis lascauxensis</i> (cepas de Lascaux, LX)								<i>Oa</i> ^c	Cepas de referencia ^c				
	A1	A3	CH2	CH3	CH7	CH16	7.2	101R-6	LXCH40	<i>Ot</i>	<i>Oan</i>	<i>Oc</i>	<i>Ob</i>	<i>St</i>
2. Fosfatasa alcalina	2	2	2	1	2	2	2	3	1	1	2	2	3	1
3. Esterasa (C4)	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4. Esterasa lipasa (C8)	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
6. Leucina arilamidasa	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	3	3	2
11. Fosfatasa ácida	3	2	2	2	3	3	3	3	4	2	4	4	4	4
12. Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	2	3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2
13. α -galactosidasa	0	0	1	1	2	0	2	3	0	0	0	0	0	0
14. β -galactosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
17. β -glucosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
18. N-acetil- β -glucosaminidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
19. α -mannosidasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

^a: La cantidad de sustrato hidrolizado correlaciona con la producción de enzimas. No hay sustrato hidrolizado (0), < 20 nmol (1), 20-40 nmol (2), 40-80 nmol (3), > 80 nmol (4).

^b: De las 19 enzimas ensayadas, sólo se muestran aquellas que dieron reacción positiva (en negrita) con alguna de las cepas analizadas. Las siguientes enzimas no se sintetizaron por ninguna de las cepas: lipasa (C4), valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina, α -quimotripsina, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, y α -fucosidasa.

^c: Abreviaturas: *Oa*: *O. anomala*; *Ot*: *O. tshanytschae*; *Oan*: *O. anellii*; *Oc*: *O. constricta*; *Ob*: *O. humicola*; *St*: *S. terreum*.



CAPÍTULO 3

DISTRIBUCIÓN DE *OCHROCONIS LASCAUXENSIS* EN LA CUEVA DE LASCAUX

El objetivo de este capítulo fue desarrollar un protocolo específico para la detección y cuantificación de *O. lascauxensis*, especie de *Ochroconis* que ha sido aislada de forma mayoritaria en la cueva de Lascaux. Para ello, se utilizó la técnica de PCR a tiempo real. Una vez puesto a punto el protocolo, se aplicó en el análisis de muestras ambientales de distinto origen, recogidas de la cueva en diferentes fechas. Se analizaron muestras de manchas sobre caliza o arcilla, sedimentos y aire. Con los resultados obtenidos pudo conocerse la distribución y evolución de este hongo en la cueva, y determinar su contribución al fenómeno de las manchas negras.

Material y métodos

Puesta a punto del protocolo de detección-cuantificación de *Ochroconis lascauxensis*

Técnica de PCR a tiempo real

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el producto “SsoFast EvaGreen Supermix” (Bio-Rad), que utiliza el fluoróforo EvaGreen, que al igual que SYBR Green I, emite fluorescencia a 530 nm de longitud de onda cuando se une a la doble cadena de ADN. Por lo tanto, en aquellas reacciones que se produce la amplificación del ADN se genera una señal de fluorescencia. El tiempo que tarda en aparecer esta señal, a lo largo de los ciclos de PCR, será indicativo de la cantidad inicial de ADN diana que posee una muestra, siendo ésta la base de la PCR cuantitativa (qPCR).

Al final del programa de PCR, los productos se someten a un incremento progresivo de temperatura hasta su completa desnaturalización. Las medidas de fluorescencia a distintas temperaturas generan la llamada curva de disociación (“melting curve”), donde cada fragmento amplificado tiene una temperatura de disociación específica. Al trabajar con EvaGreen, al igual que con SYBR Green I, siempre hay que estudiar la curva de disociación para verificar la especificidad de la secuencia amplificada.

El producto comercial utilizado incluye la enzima “Sso 7d-fusion polymerase”, la cual permite acortar considerablemente los ciclos de PCR y el tiempo total del análisis, sin perjudicar la sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad de la técnica.

Cada reacción de PCR se desarrolló en un volumen final de 20 µl, tal y como detallan las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 10 µl de “SsoFast Evagreen Supermix” 2X [Tampón de reacción que incluye la enzima polimerasa, la mezcla de desoxiribonucleótidos (dNTPs), MgCl₂, y el fluoróforo EvaGreen; concentraciones no especificadas por el fabricante], 0,2 µl de cada cebador 50 µM (Invitrogen Life Technologies), 7,6 µl de agua ultra pura estéril y 2 µl

del extracto de ADN a analizar. La concentración utilizada del extracto de ADN se detalla para cada uno de los experimentos en el apartado correspondiente. En cada tanda de reacciones se incluyeron dos controles negativos que contenían agua ultra pura estéril reemplazando el extracto de ADN.

La técnica de PCR a tiempo real se desarrolló en un termociclador iCycler IQ (Bio-Rad). El protocolo utilizado fue de PCR rápida, de acuerdo con las instrucciones del fabricante del “SsoFast Evagreen Supermix”, compuesto por los siguientes pasos: 2,5 minutos de desnaturalización inicial a 98°C, y 40 ciclos compuestos por 5 segundos de desnaturalización a 98°C y 10 segundos de apareamiento-elongación a la temperatura de “annealing” óptima para cada pareja de cebadores, detallada en el apartado siguiente. Tras cada uno de los ciclos se midió la fluorescencia a 530 nm, obteniendo los resultados en tiempo real. A continuación, para construir la curva de disociación, se llevaron a cabo 46 ciclos de 10 segundos incrementando progresivamente la temperatura en 0,5°C (de 72 a 95°C), midiendo la fluorescencia a 530 nm tras cada uno de ellos.

La programación de los ciclos de PCR, las lecturas de fluorescencia y el análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el programa informático iCycler IQ, versión 3.1 (Bio-Rad).

Tras obtener las curvas de fluorescencia expresadas en unidades de fluorescencia relativas (“relative fluorescence units”; RFU), se calculó la emisión media de fluorescencia de fondo en los ciclos iniciales, antes de aparecer la primera señal específica significativa. A continuación se determina el umbral de intensidad de fluorescencia, que se estableció en un valor diez veces superior a la desviación estándar de la emisión de fluorescencia de fondo. El número de ciclo de PCR en el cual una muestra supera este umbral se define como ciclo umbral (“Cycle threshold”, Ct). La cuantificación absoluta se llevó a cabo mediante la comparación de los valores Ct, obtenidos en el análisis de cada una de las muestras, con una recta patrón previamente elaborada.

Cebadores específicos

Basándose en los alineamientos múltiples de los dos marcadores estudiados en el capítulo 2 (ITS y RPB2), para el diseño de cebadores específicos se seleccionaron aquellas regiones conservadas en las cepas de *O. lascauxensis*, que presentaban diferencias en las otras especies evaluadas de los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium*. La selección final de los oligonucleótidos se realizó utilizando el programa “Primer Designer 4” (versión 4.20; incluida en el paquete “Clone Manager Professional Suite”), evaluando el potencial de cada oligonucleótido para ser usado como cebador. Se diseñaron seis parejas de cebadores, tres para cada marcador, que amplifican secuencias de distinto tamaño (Tabla 11).

Tabla 11. Cebadores diseñados para la detección específica de *Ochroconis lascauxensis*.

Cebador	Secuencia (5'- 3')	Marcador	Combinación	Amplicón
Olx1F	TCTTCAGGTTTCGGCGGAAGC	ITS	Olx1R	158 pb
Olx1R	TCGTTGCCAGAGCCAAGAGA	ITS		
Olx2F	CTTGGCTCTGGCAACGATGA	ITS	Olx2R	254 pb
Olx2R	GTACGAGCGATGACCGAAGT	ITS		
Olx3F	CCGCCGGTCGTATTCTCCAA	ITS	Olx3R	354 pb
Olx3R	CAGAGCCGTACGAGCGATGA	ITS		
376F	ATGCGTGGTATGGAGATGCT	RPB2	493R	118 pb
493R	TGTTGTGTCAGTCTCGTAGGA	RPB2		
151F	CGATACACCTTCGCTTCAAC	RPB2	391R	241 pb
391R	TCTCCATACCACGCATAGTC	RPB2		
347F	CGGGTGAACCTATCATTTGAG	RPB2	493R	147 pb

La especificidad de cada una de las parejas de cebadores se evaluó por PCR a tiempo real, analizando extractos de ADN de la cepa LX CH2 de *O. lascauxensis*, y de distintos hongos seleccionados en base a diferentes criterios. Por su cercanía taxonómica se evaluaron distintas especies del

género *Ochroconis*, *O. anomala*, *O. tshanytschae*, *O. anellii*, *O. constricta* y *O. humicola*. Por su abundancia en la cueva de Lascaux, basándose en el inventario de hongos anteriormente publicado por Bastian y col. (2009a), se analizaron cepas de *Geosmithia namyslowski*, *Isaria farinosa*, *Tolypocladium cylindrosporum*, *Geomyces pannorum*, *Geosmithia putterillii*, y *Engyodontium album*. Por último, se introdujeron en este estudio otras especies frecuentemente aisladas de cuevas, *Cladosporium* sp., *Aspergillus ustus*, *Pochonia chlamydosporia*, *Dotaromyces microsporus*, *Penicillium commune*, *Fusarium solani* y *Mucor circinelloides*.

La extracción de ADN genómico de estos hongos se realizó como se detalló en el capítulo 2. Para cada reacción de PCR a tiempo real se añadieron 10 ng de ADN del hongo a evaluar. Todos ellos se analizaron por duplicado. Adicionalmente, para estimar la validez de cada pareja de cebadores, se analizaron distintas concentraciones de ADN de la cepa de *O. lascauxensis* (1 ng y 0,1 ng).

Se evaluó la eficiencia de cada una de las parejas de cebadores a distintas temperaturas de “annealing”, comprendidas entre los 55 y 65°C, estableciéndose la temperatura óptima para cada una de ellas, a la cual se obtenía una elevada eficiencia sin perjuicio de su especificidad. Las tres parejas que amplifican fragmentos del marcador ITS tuvieron una temperatura óptima de 61°C, mientras que las que amplifican fragmentos del marcador RPB2 fue de 58°C.

Recta patrón

La pareja de cebadores que mostró la mejor especificidad en relación con su eficiencia se utilizó en el análisis de las muestras ambientales. Previamente hubo que elaborar la recta patrón que nos permitiera llevar a cabo la cuantificación. Ésta se construyó representando el logaritmo en base diez de la cantidad inicial de ADN molde frente a los valores Ct que se generan de su análisis. Para ello, se analizaron por triplicado siete diluciones decimales seriadas del ADN de *O. lascauxensis* LX CH2, desde los 10 ng a los 0,01 pg.

La pendiente (p) de la recta patrón obtenida fue un indicador de la eficiencia de la técnica de PCR a tiempo real desarrollada. La eficiencia (E) se calculó mediante la siguiente ecuación: $E=10(-1/p)-1$.

Adicionalmente, estos análisis nos aportan información sobre la sensibilidad que alcanza la técnica, utilizando la pareja de cebadores seleccionada, y el rango de concentraciones del hongo diana que pueden ser cuantificadas de un modo fiable.

Cuantificación de *Ochroconis lascauxensis* en muestras ambientales de la cueva de Lascaux

Muestras analizadas

La técnica desarrollada para cuantificar *O. lascauxensis* se aplicó sobre muestras de distinta naturaleza, recogidas de la cueva en diferentes fechas (Figura 25). En primer lugar, se seleccionaron 13 muestras de manchas recogidas por el personal del INRA de Dijon en los años 2008 y 2009. El criterio de selección aplicado tuvo como objetivo analizar muestras de las distintas zonas de la cueva y con diferentes características (Tabla 12).

La mayoría de las muestras seleccionadas corresponden a manchas que se desarrollaban sobre los sedimentos arcillosos de las paredes y bancos laterales, exceptuando cuatro muestras de dos manchas negras que aparecían sobre las paredes de caliza del Pasaje (A y C), donde se realizó el ensayo para evaluar la efectividad de los protocolos de limpieza y tratamiento biocida. Se recogieron muestras de las manchas antes de aplicar los tratamientos (A08 y C08) y del sedimento resultante tras ellos (A09 y C09). Cinco de las cepas de *O. lascauxensis* estudiadas en el capítulo 2 (LX A1, LX A3, LX C1, LX CC2 y LX CCCC2) se aislaron de estas manchas del Pasaje (Tabla 2).

En 2010, se realizaron dos nuevos muestreos en diferentes fechas, el 17 de febrero y el 21 de septiembre. En ellos, se recogieron ocho muestras de manchas desarrolladas sobre el sustrato arcilloso (M1-M8),

principalmente del Pasaje, y siete muestras de sedimento sin colonización aparente (S3-S9), de las distintas salas de la cueva. Adicionalmente, en septiembre, también se recogieron ocho muestras de aire de las distintas zonas de la cueva (A1-A8). Las características y localización de estas muestras se detallan en la Tabla 13 y Figura 26.

Las muestras se depositaron en tubos Eppendorf de 1,5 ml, utilizando un escalpelo estéril. Se recogieron aproximadamente 100-150 mg de cada mancha y unos 500 mg de sedimento de cada punto seleccionado. Las muestras de aire se recogieron con un equipo Coriolis (Bertin Technologies), el cual recircula un volumen determinado de aire a través de un líquido colector, donde queda retenida cualquier partícula o microorganismo presente en el aire, como las bacterias y las esporas de los hongos. En cada punto seleccionado se muestreó un volumen de 3 m³ de aire (10 min a 300 l/min), utilizando Triton X (0,005%) como líquido colector. Todas estas muestras, destinadas a análisis moleculares, se mantuvieron en frío hasta la llegada al laboratorio. Una vez allí, se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

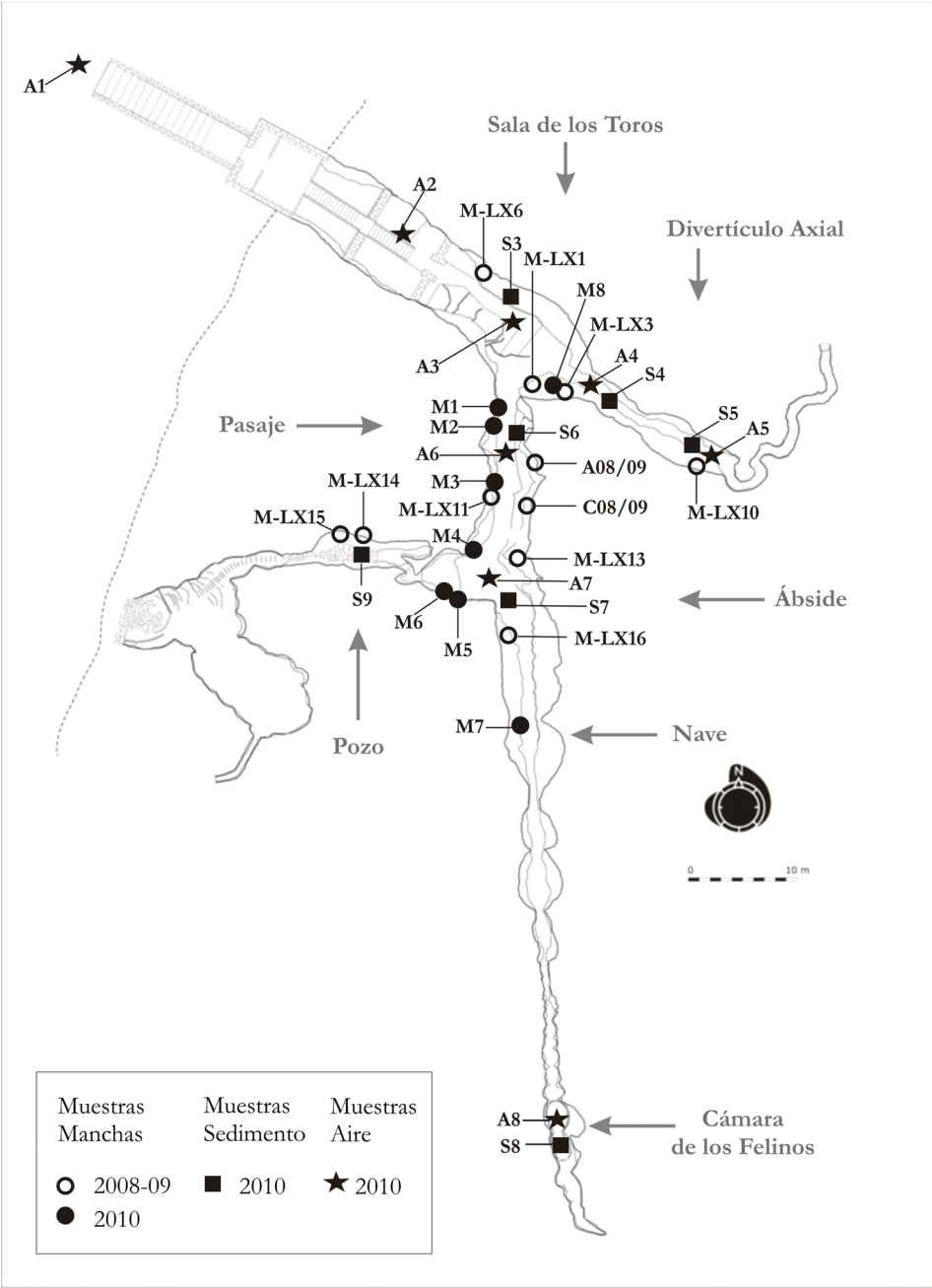


Figura 25. Localización en la cueva de Lascaux de las muestras de manchas, sedimentos y aire utilizadas en este estudio.

Tabla 12. Descripción de las muestras recogidas en los años 2008 y 2009.

Muestras	Características	Localización	Fecha
A08	Mancha negra A, antes del ensayo limpieza-biocidas, caliza	Pasaje a la izquierda	26/08/2008
C08	Mancha negra C, antes del ensayo limpieza-biocidas, caliza	Pasaje a la izquierda	26/08/2008
M-LX1	Mancha negra, zona húmeda, arcilla	Sala de los Toros, plano inclinado derecho	07/10/2008
M-LX3	Mancha negra, zona muy húmeda, arcilla	Sala de los Toros, plano inclinado derecho	07/10/2008
A09	Sedimento A, tras el ensayo (limpieza superficial y biocidas), caliza	Pasaje a la izquierda	17/02/2009
C09	Sedimento C, tras el ensayo (limpieza profunda y biocidas), caliza	Pasaje a la izquierda	12/02/2009
M-LX6	Mancha negra seca, con colémbolos, arcilla	Sala de los Toros, a la izquierda	20/10/2009
M-LX10	Mancha negra, abundantes colémbolos, arcilla	Divertículo Axial, al fondo a la derecha, a continuación del Caballo Invertido	20/10/2009
M-LX11	Mancha negra-rosa, arcilla	Pasaje, al comienzo a la derecha	20/10/2009
M-LX13	Mancha negra, aspecto de excrementos, en placa de arcilla sobre roca	Pasaje, final a la izquierda	20/10/2009
M-LX14	Mancha negra-rosa, arcilla	Encima del Pozo, cota derecha al fondo	20/10/2009
M-LX15	Mancha negra plana y húmeda, arcilla	Encima del Pozo, cota derecha al fondo	20/10/2009
M-LX16	Mancha negra seca, arcilla	Nave, cota derecha bajo el Friso de Ciervos Nadando	20/10/2009

Tabla 13. Descripción de las muestras recogidas en el año 2010.

Muestras	Características	Localización	Fecha ^a
M1	Mancha negra homogénea, presencia de colémbolos, arcilla	Pasaje, al comienzo, en la banqueta derecha	F, S
M2	Mancha negra homogénea, arcilla	Pasaje, al comienzo, en la banqueta derecha	F, S
M3	Mancha negra-rosa, arcilla	Pasaje, a mediación, en la banqueta derecha	F, S
M4	Mancha negra homogénea, arcilla	Pasaje-Ábside, banqueta derecha	F, S
M5	Mancha negra circular, con abundantes colémbolos, arcilla	Ábside superior, pared izquierda	F, S
M6	Mancha negra con forma de anillo, que reapareció tras limpieza, arcilla	Ábside superior, pared izquierda	F, S
M7	Mancha verde-amarillo, presencia de colémbolos, arcilla	Nave, a mediación, en la banqueta derecha	F, S
M8	Mancha negra homogénea en zona muy húmeda, arcilla	Sala de los Toros-Divertículo Axial, en la banqueta derecha	F, S
S3	Sedimento	Sala de los Toros	F, S
S4	Sedimento	Divertículo Axial, al comienzo	F, S
S5	Sedimento	Divertículo Axial, al final	F, S
S6	Sedimento	Pasaje	F, S
S7	Sedimento	Nave	F, S
S8	Sedimento	Cámara de los Felinos	F, S
S9	Sedimento	Pozo	F, S
A1	Aire	Exterior de la cueva	S
A2	Aire	Sala SAS2	S
A3	Aire	Sala de los Toros	S
A4	Aire	Divertículo Axial, al comienzo	S
A5	Aire	Divertículo Axial, al final	S
A6	Aire	Pasaje	S
A7	Aire	Pasaje-Ábside-Nave	S
A8	Aire	Cámara de los Felinos	S

^a: F: 16 y 17 de febrero; S: 21 de septiembre.

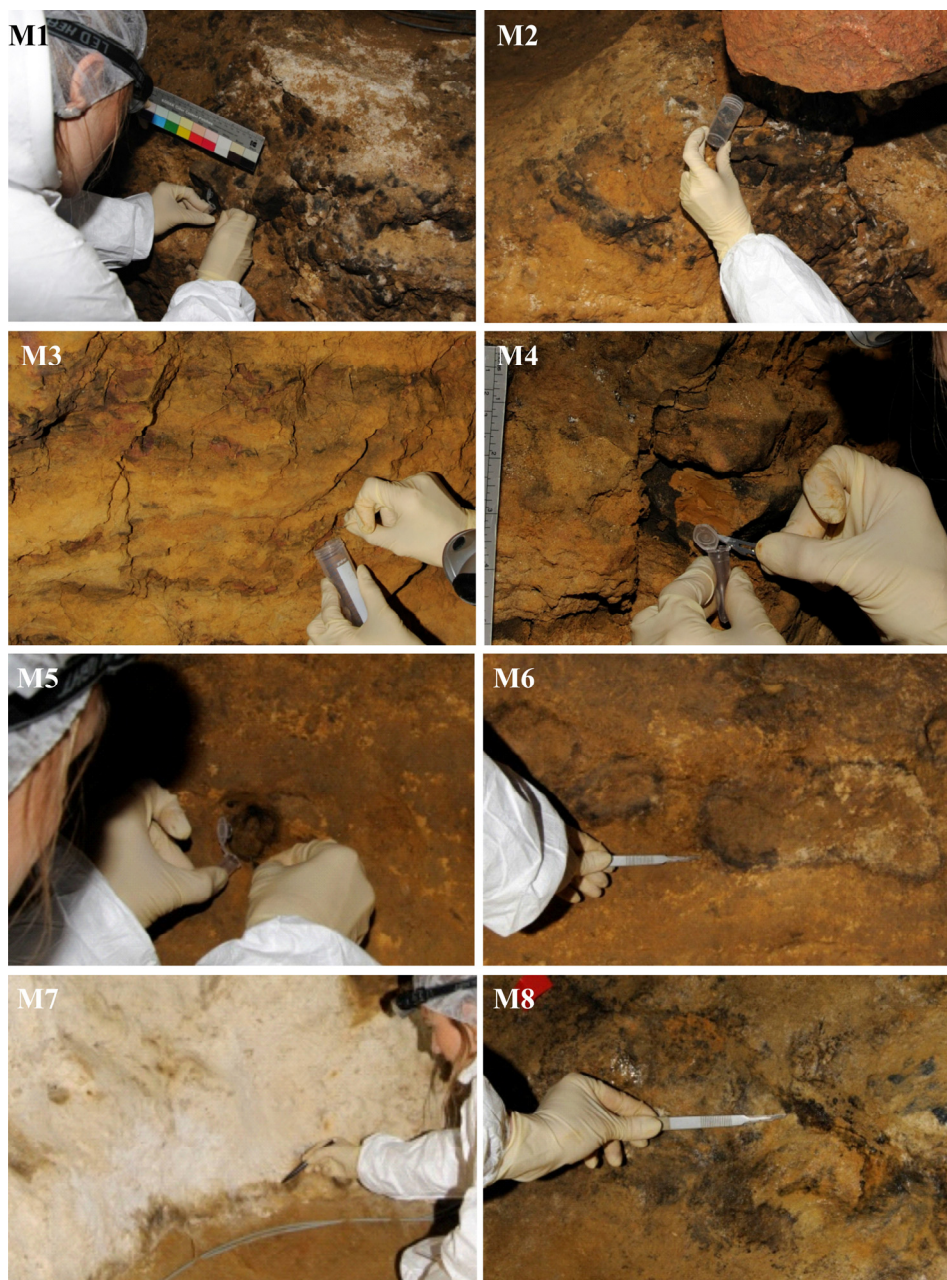


Figure 26. Detalle de las manchas muestreadas en febrero y septiembre de 2010 (M1-M8).

Extracción de ADN de muestras ambientales

La extracción de ADN de estas muestras se realizó utilizando el “FastDNA SPIN Kit for Soil” (MP Biomedicals), siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente, se pesó con exactitud la cantidad de partida de cada muestra de mancha o sedimento para los posteriores cálculos de cuantificación. Las muestras de aire recogidas en Triton-X se filtraron utilizando filtros de 0,22 μm de diámetro de poro (Millipore). A partir de estos filtros se realizó la extracción de ADN utilizando el kit especificado, con alguna modificación del protocolo. Tras la homogenización de los filtros en tampón fosfato sódico, utilizando un equipo Fast-Prep24, se incubaron durante 20 minutos a 65°C y se repitió el paso de homogenización, con ello se incrementó la eficiencia del protocolo de extracción de ADN. El volumen de agua ultra pura estéril en el que se resuspendió el ADN extraído varió según el tipo de muestra, 100 μl para muestras de mancha o sedimento y 50 μl para muestras de aire. La concentración de ADN resultante se cuantificó utilizando un equipo NanoDrop 1000, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de la extracción se conservaron a -80°C hasta su uso.

Cuantificación de Ochroconis lascauxensis

El análisis por PCR a tiempo real se realizó como se detalló anteriormente. Para cada una de las muestras se analizaron por duplicado el producto de la extracción de ADN y distintas diluciones de ellos.

El grado de las diluciones realizadas dependió del tipo de muestra, siendo mayor en las muestras de manchas y sedimento (mayor cantidad de ADN extraído y posibles inhibidores), y menor en las muestras de aire. Las diluciones analizadas para las muestras de manchas fueron 1:10, 1:25, y otra fijando la concentración de ADN a 5 ng/ μl . Para las muestras de sedimento, 1:5, 1:10, y otra fijando la concentración de ADN a 5 ng/ μl . Para las muestras de aire, 1:5, y otra fijando la concentración de ADN a 5 ng/ μl . Además, para las muestras de aire se añadieron reacciones en las que se

aumentó el volumen del extracto de ADN analizado (4 y 8 µl por reacción), incrementando la posibilidad de detectar las bajas concentraciones de esporas en este tipo de muestras.

La cuantificación se realizó extrapolando los valores medios de Ct en la recta patrón y llevando a cabo los cálculos oportunos considerando la cantidad inicial de muestra procesada y la dilución correspondiente. Aquellos valores Ct que no fueron coherentes con el resto de medidas obtenidas para las distintas diluciones no se tuvieron en cuenta, ya que éstos podían deberse a la presencia de inhibidores u otros errores experimentales. Las cuantificaciones de *O. lascauxensis* se expresaron como cantidad de ADN del hongo presente en cada muestra (pg ADN/mg de mancha o sedimento; pg ADN/m³ aire). Además, se calcularon los porcentajes de ADN que representa dicho hongo, dividiendo el ADN de *O. lascauxensis* entre el ADN total de la muestra. Estos valores se consideraron una estimación de la abundancia de este hongo con respecto a la microbiota total de una muestra.

Resultados y discusión

Puesta a punto del protocolo de detección-cuantificación de *Ochroconis lascauxensis*

Especificidad de cebadores

La especificidad de los cebadores diseñados se evaluó por PCR a tiempo real, analizando la misma cantidad de ADN (10 ng) de cada uno de los hongos seleccionados. Los resultados de estos análisis se detallan en la Tabla 14. Como se puede observar, las tres parejas de cebadores que amplifican en las regiones ITS (Olx1F/R, Olx2F/R y Olx3F/R), presentaron numerosas reacciones cruzadas con otros hongos, aunque todas ellas aparecieron mucho más tarde ($Ct > 26$) que en *O. lascauxensis* (valores Ct comprendidos entre 15,4 y 18,3 según la pareja utilizada).

Respecto las parejas de cebadores que amplifican en la región RPB2, 376F/493R también presentó numerosas reacciones cruzadas ($Ct > 25$), aunque muchas de ellas se debieron a fragmentos amplificados de forma inespecífica que se distinguieron analizando su curva de disociación. La pareja 151F/391R sólo presentó reacciones cruzadas específicas con *O. tsbanytschae*, *O. humicola* y *Cladosporium* sp. (valores Ct : 35,4; 23,4; y 35,2; respectivamente), aunque algunos otros hongos ocasionaron señales inespecíficas. Claramente, los mejores resultados se obtuvieron con los cebadores 347F/493R, que tan sólo dieron reacciones cruzadas con *O. anomala*, *O. tsbanytschae* y *O. constricta*, y en ciclos muy tardíos (valores Ct : 35,8; 34,9 y 35,7; respectivamente); mientras que la misma cantidad de ADN (10 ng) de *O. lascauxensis* tuvo un Ct de 20,7. Esta gran diferencia, de aproximadamente 15 ciclos, es más que suficiente para validar el uso de estos cebadores despreciando estas reacciones cruzadas, que en ningún caso van a influir en el análisis de muestras naturales, en las condiciones experimentales descritas. Por lo tanto, se seleccionó esta pareja de cebadores para llevar a cabo los siguientes análisis.

Tabla 14. Evaluación de la especificidad de los cebadores, analizando ADN de hongos por PCR a tiempo real.

Cepas evaluadas ^{ab}	Detección PCR tiempo-real (valores Ct) ^c					
	Olx1F Olx1R	Olx2F Olx2R	Olx3F Olx3R	376F 493R	151F 391R	347F 493R
<i>O. lascauxensis</i> LX CH2 (10 ng)	18,3	15,4	15,5	21	20	20,7
<i>O. lascauxensis</i> LX CH2 (1 ng)	22,3	19,3	19,6	25,2	23,9	24,5
<i>O. lascauxensis</i> LX CH2 (0,1 ng)	26,9	23,8	23,8	29	27,7	28
<i>O. anomala</i> LX CH40	33,6,	32,6	26,5	28,3	-	35,8
<i>O. tshanytschae</i> CBS 100438	30,4 ^d	-	38,1 ^d	30,1 ^d	35,4	34,9
<i>O. anellii</i> CBS 284.64	34,3 ^d	33,9	27,8 ^d	27,8	-	-
<i>O. constricta</i> CBS 211.53	36,7 ^d	36,2 ^d	36,1	37,5 ^d	-	35,7
<i>O. constricta</i> CMF 1161	37,9 ^d	31 ^d	-	25,3	-	-
<i>O. humicola</i> CBS 116655	33,2	30,8	31,7	-	23,4	
<i>O. humicola</i> CMF 1005	36,3 ^d	30,9 ^d	36,4	25,2	-	-
<i>Geosmithia namyslowski</i> CCF 3049	34,4	31,8	33,6	36,8 ^d	38 ^d	-
<i>Geosmithia putterilli</i> CCF 3052	33,9	33,9	33,9	33,0 ^d	38,6 ^d	-
<i>Isaria farinosa</i> CI P3	37,8	31,9	32,6	28,7 ^d	-	-
<i>Tolyposcladium cylindrosporum</i> CMF 1445	31,1	28,6	26,5 ^d	29 ^d	37,9 ^d	-
<i>Geomyces pannorum</i> CMF 1597	36,2 ^d	34,4	34,1 ^d	38 ^d	-	-
<i>Geomyces pannorum</i> LX TR	35	31,7	31,9	34,4 ^d	-	-
<i>Geomyces pannorum</i> LX PR4-2	34,3	30,8	30	34,9	-	-
<i>Engyodontium album</i> CMF 1467	32,9	26,1 ^d	31,5	33,8	33,5 ^d	-
<i>Cladosporium</i> sp. LX ST	33,8	31,5	32,8	36	35,2	-
<i>Cladosporium</i> sp. CI 16P2	34,2	29,6	33,2	31 ^d	-	-
<i>Aspergillus ustus</i> CI J9	32,6	29,1	29,2	-	37 ^d	-
<i>Pochonia chlamydosporia</i> CI4D1	35,6 ^d	32,7	33,5	32,8	-	-
<i>Doratomyces microsporus</i> CI 33G3	-	37,1	35,2	36,4	37,3 ^d	-
<i>Penicillium commune</i> CI66N1	-	35,8	-	35,7	38,2 ^d	-
<i>Fusarium solani</i> CI T1H1	33,1	35,8	38,4	34,6	-	-
<i>Mucor circinelloides</i> CI0303091	-	36,6	34,7	37,2	-	-

Tabla 14 (Continuación).

^a: Se analiza una cantidad de ADN idéntica (10 ng) para cada una de las cepas evaluadas. Sólo para la cepa de *O. lascauxensis* se analizaron también cantidades menores de ADN: 0,1 y 1 ng.

^b: Procedencia de cepas: LX y CI, cepas aisladas respectivamente de la cueva de Lascaux y de la cueva de Castañar de Ibor (Cáceres, España), depositadas en la colección de hongos del Laboratorio del Prof. Cesáreo Sáiz Jiménez, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (España); CBS, “Centraalbureau voor Schimmelcultures” (Utrecht, The Netherlands); CMF, Colección de Hongos Microscópicos del Instituto de Biología del Suelo (Ceské Budejovice, República Checa); CCF, Colección de Cultivos de Hongos del Departamento de Botánica, Universidad Carlos (Praga, República Checa)

^c: Los valores Ct mostrados son medias de dos reacciones independientes.

^d: Valores Ct que corresponden a reacciones inespecíficas distinguibles analizando la curva de disociación. Las temperaturas de disociación específicas de los fragmentos amplificados con cada pareja de cebadores fueron: 85°C (Olx1F/R), 90°C (Olx2F/R), 91°C (Olx3F/R), 87°C (376F/493R), 88°C (151F/391R) y 87°C (347F/493R).

Recta patrón

Para la posterior cuantificación en muestras ambientales, se elaboró una recta patrón con los cebadores seleccionados (347F/493R) (Figura 27). La recta patrón obtenida tuvo un buen ajuste lineal, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,996; y una elevada eficiencia de PCR ($E=92,7\%$).

Utilizando estos cebadores se alcanzó una sensibilidad de un 1 pg de ADN (mínima cantidad detectable), y se obtuvieron reacciones positivas en las tres réplicas analizadas con esta cantidad, con un valor medio de Ct de 35,58. La cantidad de ADN de 0,1 pg tan sólo se detectó en una de las réplicas (Ct=37), este valor no se tuvo en cuenta a la hora de elaborar la recta definitiva. Por lo tanto, utilizando esta recta patrón, se pudieron cuantificar de un modo fiable las concentraciones de ADN del hongo diana comprendidas entre 10 ng y 1 pg (Ct: 20,69-35,58). Los valores $Ct \geq 36$ no se tuvieron en cuenta en los posteriores análisis, pues éstos correspondieron a cantidades de ADN no detectables bajo las condiciones experimentales establecidas.

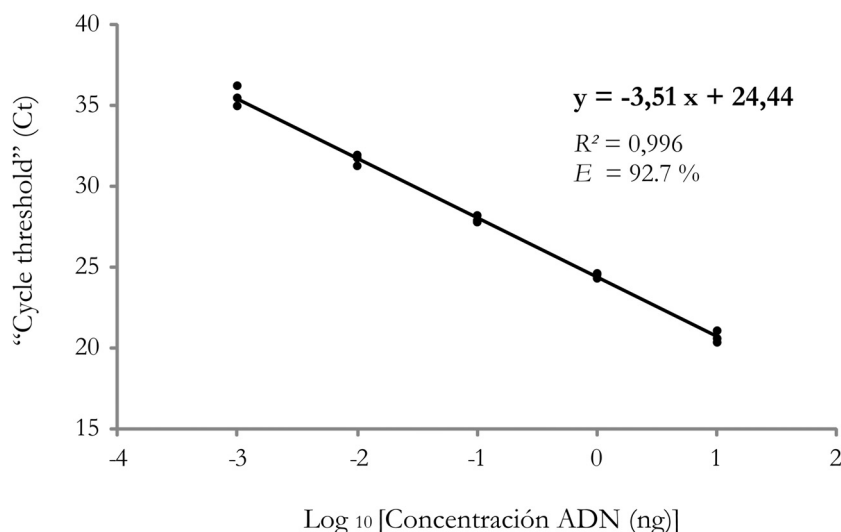


Figura 27. Recta patrón elaborada utilizando la pareja de cebadores 347F/493R, siendo R^2 el coeficiente de correlación, y E la eficiencia de PCR.

Cuantificación de *Ochroconis lascauxensis* en muestras ambientales de la cueva de Lascaux

Manchas negras recogidas en 2008 y 2009

Se detectó ADN de *O. lascauxensis* en todas las muestras de manchas recogidas en 2008 y 2009 (Fig. 28a). Los niveles encontrados en estas muestras, excepto en las muestras de sedimento de las manchas limpiadas (A09 y C09), oscilaron generalmente entre 0,1 y 10 ng/mg. Las máximas concentraciones se detectaron en la mancha M-LX6, presente en la Sala de los Toros (7,4 ng/mg; 9,8% del ADN total), y en las dos manchas que aparecían sobre las paredes de caliza del Pasaje, antes de ser limpiadas y tratadas con biocidas, A08 (6,05 ng/mg; 3,9% del ADN total) y C08 (19,6 ng/mg; 7,5% del ADN total). Tras la limpieza y tratamiento de estas dos manchas, las muestras de sedimento (A09 y C09) aún presentaron ADN del

hongo, aunque sus niveles se habían reducido considerablemente (54,1 y 51,4 pg/mg; 0,003 y 0,005% del ADN total; respectivamente).

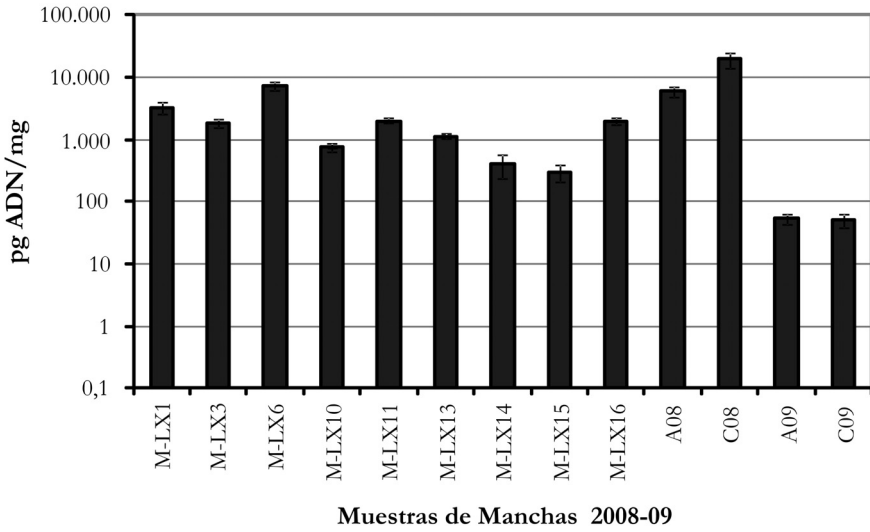
Manchas recogidas en 2010

Al igual que ocurrió en las muestras de años anteriores, se detectó ADN de *O. lascauxensis* en todas las muestras de manchas recogidas en febrero y septiembre del 2010 (Fig. 28b). Los niveles encontrados fueron aproximadamente un orden de magnitud inferior, oscilando entre 0,01 y 1 ng/mg. La máximas cantidades detectadas correspondieron a las siguientes muestras: manchas negras M5 y M6 recogidas en febrero de zonas cercanas entre sí del Ábside (2,1 y 4,2 ng/mg; 2,6 y 2,5% del ADN total; respectivamente), y de nuevo en la muestra M6 recogida en septiembre (7,9 ng/mg; 3,1% del ADN total). La menor cantidad apareció en la mancha negra M4 recogida en febrero de la zona del Pasaje que comunica con el Ábside (1 pg/mg; 0,0008% del ADN total), cantidad cercana al límite de detección.

Respecto a las dos manchas con distinta coloración, M3 (negra-rosa), situada en el Pasaje cerca de las manchas negras M1 y M2, y M7 (verde-amarilla), situada en la Nave, también se detectó *O. lascauxensis* en ambas, con una concentración considerablemente superior en la mancha M3.

Si se analiza la evolución de *O. lascauxensis* en las ocho manchas estudiadas, comparando los recuentos en febrero y septiembre, se pudo observar que las poblaciones permanecieron bastante estables a lo largo del año de estudio. Se produjo un incremento en seis de las ocho muestras, siendo especialmente relevante en la mancha negra M4, cuya cantidad aumentó en dos órdenes de magnitud. Por el contrario, en las manchas negras M1 y M5 disminuyó la cantidad.

(a)



(b)

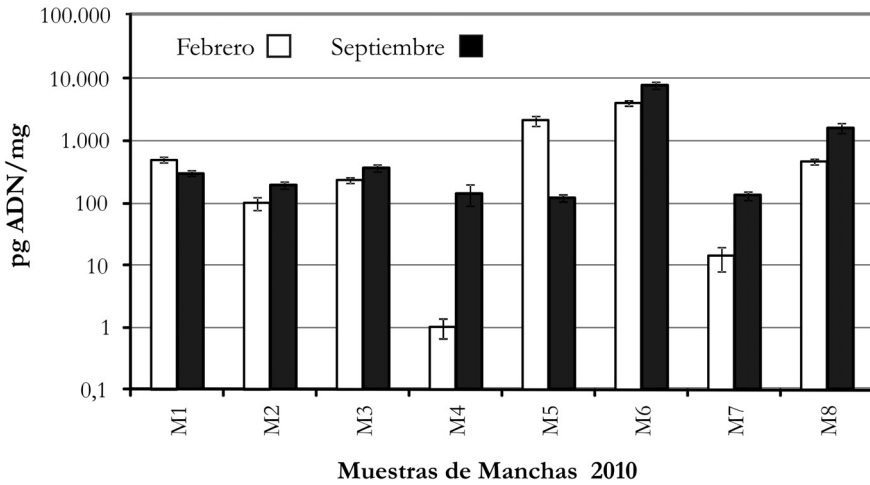


Figura 28. Cuantificación de *O. lascauxensis* en las muestras de manchas seleccionadas. **a.** Muestras recogidas en 2008 y 2009. **b.** Muestras recogidas en 2010. Se muestran los valores medios con su correspondiente error estándar.

Muestras de sedimento y aire de 2010

En los sedimentos de todas las zonas estudiadas de la cueva también se detectó ADN de *O. lascauxensis*, ya fuera en febrero y/o septiembre (Fig. 29a). Los niveles encontrados en este tipo de muestras fueron generalmente bastante menores que en las manchas, confirmando la asociación de este hongo a las manchas presentes en la cueva de Lascaux. En las muestras S3-Sala de los Toros, S6-Pasaje y S7-Ábside, la concentración de ADN del hongo se encuentra generalmente comprendida entre 4,8 y 100 pg/mg, alcanzando la máxima cantidad en el sedimento S3 recogido en febrero (0,4 ng/mg; 2,1% del ADN total). En el resto de zonas, más distantes del Pasaje (S4 y S5-Divertículo Axial, S8-Cámara de los Felinos y S9-Pozo), las cantidades detectadas fueron inferiores, estando comprendidas generalmente entre 0,1 y 1 pg, siendo el sedimento S5 recogido en febrero donde se detectó la menor concentración (0,08 pg/mg; 0,001% del DNA total), cantidad próxima al límite de detección.

En febrero, se obtuvieron resultados positivos en cinco de los siete puntos analizados, siendo especialmente abundante en el Pasaje y sus alrededores (S3, S6 y S7). Esto concuerda con la distribución actual de las principales manchas negras en la cueva. En septiembre, se mantuvo la misma distribución con leves modificaciones, y se extendió a las zonas más alejadas (S8 y S9), donde anteriormente no se había encontrado. Por lo tanto, en la actualidad, la distribución de *O. lascauxensis* en los sedimentos de la cueva es generalizada.

De las muestras de aire recogidas en septiembre, se obtuvieron resultados positivos en cinco de los ocho puntos analizados, lo cual indicó que este hongo dispersa sus esporas por el aire de forma eficiente. La cantidad de ADN de *O. lascauxensis* fue más abundante en el Pasaje (A6; 35,3 pg/m³) y al comienzo del Divertículo Axial (A4; 24,3 pg/m³). Ambas zonas presentaron manchas negras, siendo especialmente relevantes en el Pasaje. En la Sala de los Toros (A3) y Divertículo Axial profundo (A5), zonas próximas a las anteriormente mencionadas, se detectaron cantidades inferiores (10,1 y 8,8 pg/m³, respectivamente).

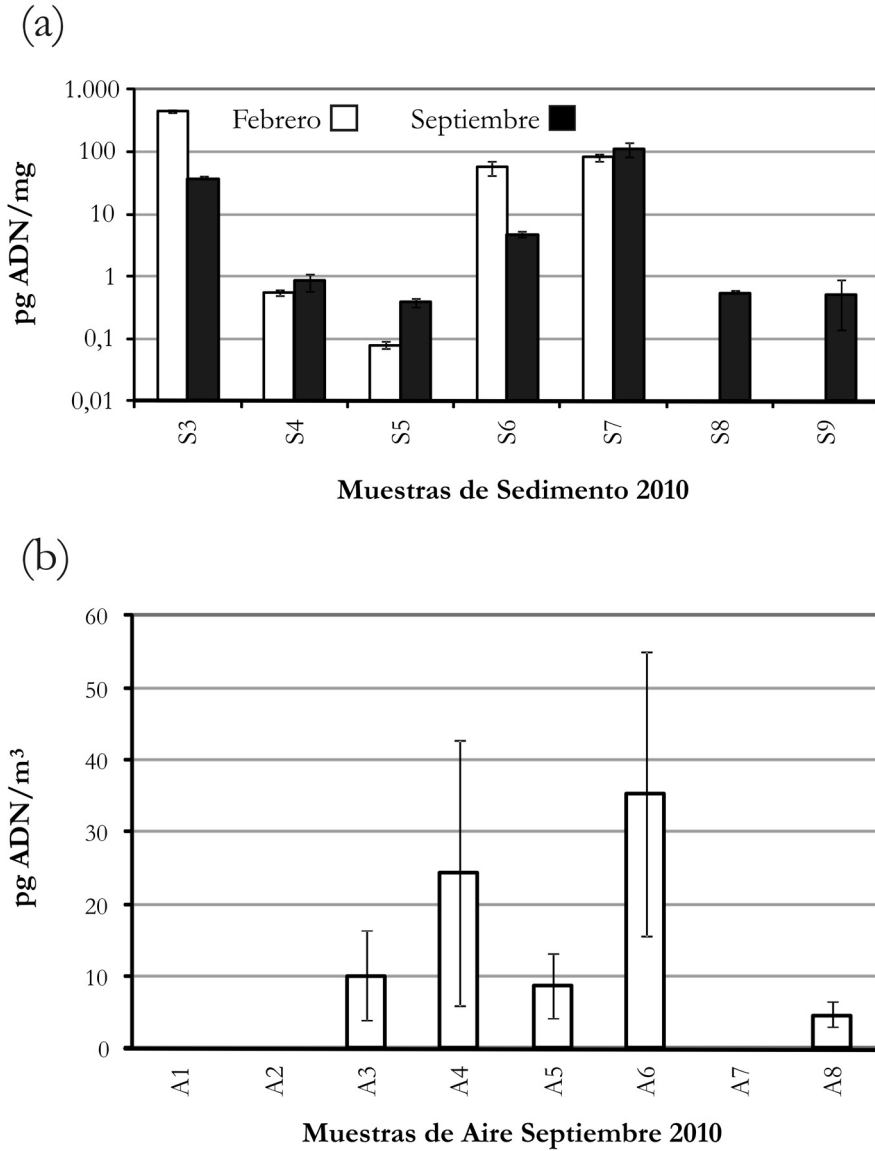


Figura 29. Cuantificación de *O. lascauxensis* en las muestras de sedimento recogidas en febrero y septiembre de 2010 (a) y muestras de aire recogidas en septiembre de 2010 (b). Se muestran los valores medios con su correspondiente error estándar.

La concentración mínima encontrada correspondió al Pozo (A8; 4,6 pg/m³). Los porcentajes de ADN de *O. lascauxensis* estuvieron comprendidos entre 0,0009 y 0,004% del ADN total, lo que indicó que esta especie representa una cantidad mínima respecto al total de hongos y bacterias del aire. Los bajos niveles cuantificados demostraron la elevada sensibilidad de la técnica, siendo capaz de detectar el ADN correspondiente a unas pocas esporas.

Conviene destacar que las esporas de *O. lascauxensis*, presentes en el aire de la cueva, no proceden del exterior, pues no se detectaron ni en el exterior de la cueva (A1), ni en la sala de entrada SAS2 (A2). Estos resultados fueron coincidentes con otro estudio aerobiológico basado en técnicas dependientes de cultivo, que analizó las mismas zonas de la cueva (Porca 2011). En febrero de 2010 se aislaron colonias del género *Ochroconis* (principalmente representado por *O. lascauxensis*) en cinco de las siete zonas muestreadas en el interior de la cueva, Sala de los Toros, Divertículo Axial, Pasaje, Ábside y Pozo, mientras que en el exterior y en la sala SAS2 no se detectaron.

Tras aplicar esta técnica a muestras de distintos sustratos de la cueva de Lascaux, se demostró la asociación de *O. lascauxensis* con las manchas presentes en la cueva. Las concentraciones del hongo detectadas en las manchas fueron en líneas generales muy superiores a aquellas que se detectaron en muestras de sedimento sin colonización aparente, mostrando diferencias de aproximadamente 2-3 órdenes de magnitud cuando se compararon las muestras recogidas en las mismas fechas, febrero y septiembre de 2010 (Figs. 28b y 29a).

Cabe destacar que la gran mayoría de las muestras de manchas analizadas procedían de colonizaciones desarrolladas sobre los sedimentos arcillosos de las paredes y bancos laterales, exceptuando las manchas de las zonas A y C de las paredes de caliza del Pasaje (Tablas 12 y 13). Teniendo en cuenta que *O. lascauxensis* se encontró principalmente asociado a las manchas negras desarrolladas sobre la roca caliza (capítulo 2, Tabla 2), si se hubiera analizado un mayor número de muestras de este tipo, posiblemente

se habrían registrado concentraciones muy superiores, y las diferencias con las muestras de sedimento serían aún mayores. De hecho, en las dos manchas sobre la roca caliza, antes de su limpieza y tratamiento biocida, se obtuvieron dos de las concentraciones más elevadas (A08=6,1 ng/mg y C08=19.6 ng/mg), y seis meses después, tras sucesivos tratamientos, la concentración del hongo disminuyó considerablemente pero no se eliminó (Fig. 28a).

Las mayores concentraciones registradas en muestras de sedimento correspondieron a las salas de la cueva principalmente afectadas por el fenómeno de las manchas negras, S3-Sala de los Toros, S6-Pasaje y S7-Ábside (Fig. 29a). Del mismo modo, los resultados obtenidos en las muestras de aire recogidas en septiembre de 2010 también coincidieron con la presencia de manchas negras, obteniendo las concentraciones más elevadas en el Pasaje (A6) y al comienzo del Divertículo Axial (A4), seguidas por las muestras recogidas de zonas adyacentes.

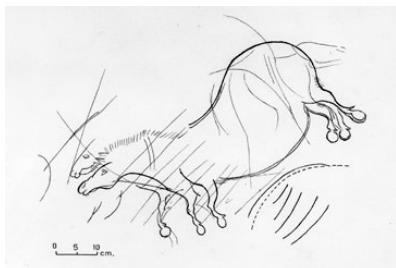
Con respecto a la evolución de *O. lascauxensis* en el tiempo, fue significativo que las mayores concentraciones se detectaron en las manchas recogidas en 2008-2009 (Fig. 28). Por lo general, las concentraciones en estos años fueron un orden de magnitud superior a las de las manchas recogidas en 2010. Estos resultados indican que la población de *O. lascauxensis* en las manchas negras está decreciendo progresivamente en los últimos años. Las poblaciones de *O. lascauxensis* se mantuvieron bastante estables, a lo largo del 2010, entre febrero y septiembre, tanto en las muestras de manchas como en las de sedimento. El incremento más significativo se produjo en la mancha M4 localizada en el Pasaje. Además, la distribución del hongo en los sedimentos de la cueva se amplió significativamente en septiembre, alcanzando las zonas más inaccesibles, S8-Cámara de los Felinos y S9-Pozo.

En futuros estudios sería interesante desarrollar las correspondientes técnicas de detección-cuantificación específica de otros hongos relevantes en las manchas negras (detectados en el capítulo 4). La aplicación conjunta

de estas técnicas aportaría una mayor información sobre la evolución de las comunidades fúngicas asociadas a las manchas negras.

Como se ha indicado, a pesar de haberse reducido en los últimos años la concentración de *O. lascauxensis* en las manchas, este hongo sigue presente en todos los nichos de la cueva, ampliamente distribuido por todas sus galerías. Aunque las concentraciones detectadas en las muestras de sedimento y aire son bastante reducidas, no se debería descuidar el seguimiento y control de la cueva. Múltiples circunstancias pueden alterar el medio ambiente de la cueva provocando una rápida expansión del brote con el consiguiente riesgo de alterar las valiosas pinturas rupestres que alberga.

La técnica de PCR a tiempo real ha sido ampliamente utilizada como técnica cuantitativa en diferentes áreas de estudio, entre otras: diagnóstico (Bienapfl y col. 2011, Chaturvedi y col. 2011), aerobiología (Haugland y col. 2004, Kaarakainen y col. 200) y ecología microbiana (Smith y Osborn 2009, Chemidlin Prévost-Bouré y col. 2011). La técnica desarrollada en este estudio demostró ser útil para estimar de un modo fiable la distribución de *O. lascauxensis* en la cueva de Lascaux, siendo la primera vez que se utiliza esta técnica en el campo de la ecología microbiana de ambientes subterráneos. Este tipo de técnicas pueden resultar de gran utilidad para la prevención y el seguimiento de los brotes fúngicos o cualquier tipo de colonización microbiana en cuevas, principalmente en aquellas que poseen algún tipo de arte rupestre, dada la importancia de su conservación.



CAPÍTULO 4

ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES FÚNGICAS DE LAS MANCHAS DE LA CUEVA DE LASCAUX

El objetivo de este capítulo fue caracterizar las comunidades fúngicas mayoritarias de las manchas de la cueva de Lascaux, centrando la atención en aquellas manchas negras que actualmente persisten en determinadas áreas de la cueva, principalmente desarrolladas sobre los sedimentos arcillosos de las paredes y bancos laterales. Para ello, se utilizaron diferentes técnicas moleculares y de aislamiento en medios de cultivo.

Se analizaron muestras recogidas en distintas fechas con el objeto de conocer la evolución de estas comunidades, y se evaluó el efecto de los tratamientos biocidas. Además se identificaron las comunidades fúngicas metabólicamente activas en las manchas negras.

Aquellos hongos que mostraron una asociación clara con las manchas negras fueron identificados y caracterizados.

Material y métodos

Caracterización molecular de las comunidades fúngicas

Muestras y análisis realizados

Inicialmente, se caracterizaron por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) una selección de hongos previamente aislados de la cueva de Lascaux, principalmente de muestras de manchas. Entre ellos, fueron analizadas todas las cepas de *O. lascauxensis* y *O. anomala* (Tabla 2), cuyos resultados se compararon con las cepas de referencia de los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium* (Tabla 3), obtenidas de la colección de hongos del CBS.

Se obtuvieron los perfiles DGGE correspondientes a las comunidades fúngicas de las 21 muestras de manchas analizadas en el capítulo 3; sus características y localización se detallan en las Tablas 12 y 13, y en la Figura 25. Éstas se recogieron, como se indica en el capítulo 3, de distintas áreas de la cueva durante tres años de estudio (2008-2010), permitiendo caracterizar la evolución de las comunidades fúngicas. Cuatro de las muestras recogidas en 2008 y 2009 (A08, A09, C08 y C09) procedieron del ensayo de evaluación de los protocolos de limpieza y biocidas, aplicados sobre dos manchas negras de las paredes de roca caliza del Pasaje.

Para determinar las comunidades de hongos que estaban metabólicamente activas en las manchas, se seleccionaron tres muestras de manchas negras con diferente apariencia (M1, M6 y M8) y una mancha negra-rosa (M3), localizadas sobre el sustrato arcilloso de distintas salas. Todas ellas se recogieron en septiembre de 2010 (Tabla 13, Fig. 25). Se realizó un análisis comparativo ADN-ARN por DGGE, donde el ADN representa la totalidad de hongos de una muestra, estén activos o no (incluyendo las esporas), y el ARN representa sólo a los hongos metabólicamente activos.

Adicionalmente, para conocer si los hongos de las manchas se dispersan por el aire, se analizaron los perfiles DGGE de las comunidades fúngicas de las ocho muestras de aire recogidas en septiembre de 2010 (Tabla 13).

Con los resultados de los análisis de DGGE, posteriormente se construyeron nueve genotecas correspondientes a algunas muestras representativas, con el objeto de profundizar en el estudio de sus comunidades fúngicas (Fig. 30).

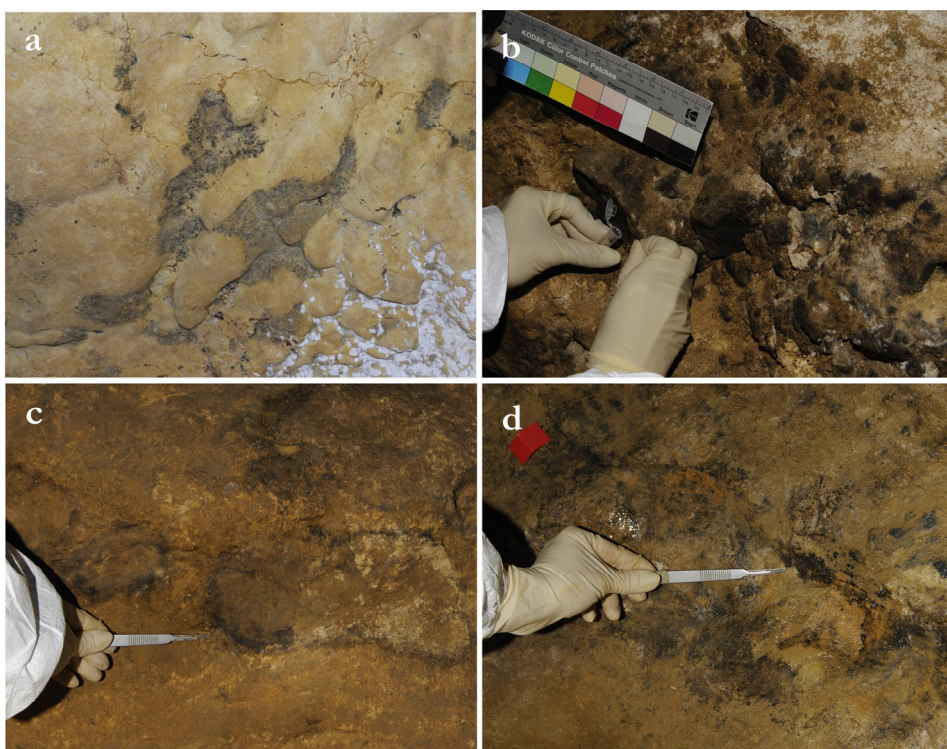


Figura 30. Muestras de manchas negras utilizadas para la construcción de genotecas. **a.** Muestra C08 localizada sobre la roca caliza de la pared izquierda del Pasaje, antes de los tratamientos de limpieza y biocidas. **b.** Muestra M1 en el banco derecho del Pasaje. **c.** Muestra M6 en la pared izquierda del Ábside superior, con forma circular. **d.** Muestra M8 en un área de percolación de agua en la Sala de los Toros, situada entre el Pasaje y el Divertículo Axial.

Para evaluar la eficacia de los tratamientos de control aplicados, se construyeron genotecas con los extractos de ADN de las muestras C08 y C09. Las principales comunidades metabólicamente activas de las manchas negras actuales se identificaron con las genotecas correspondientes a los extractos de ADN y ARN de las muestras M1, M6 y M8, recogidas en septiembre de 2010. Además, se construyó la genoteca de la muestra de aire del Pasaje (A6), con objeto de concretar que hongos se dispersan por el aire en la principal zona afectada de manchas negras.

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ADN de las cepas fúngicas se realizó siguiendo el protocolo detallado en el capítulo 2. La extracción de ADN de las muestras de manchas y aire se realizó utilizando el “FastDNA SPIN Kit for Soil” (MP Biomedicals), como se detalló en el capítulo 3.

Para aquellas muestras de manchas utilizadas en el análisis de los hongos metabólicamente activos, la extracción de los ácidos nucleicos totales se realizó siguiendo el método de Griffiths y col. (2000), con algunas modificaciones, permitiendo el análisis en paralelo del ADN y ARN. Para evitar la degradación del ARN, durante todo el proceso de extracción las muestras se mantuvieron en hielo, se utilizó una centrífuga refrigerada a 4°C, y todo el material de plástico y las soluciones empleadas fueron previamente esterilizados en autoclave. Se partió de unos 100-150 mg de muestra recogida en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, a los que se añadieron perlas de vidrio de 2 y 4 mm de diámetro, 500 µl de tampón de extracción CTAB [Tris 100 mM, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 2%; pH 8] y 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) para la purificación de los ácidos nucleicos. La mezcla se homogenizó utilizando un equipo Fast-Prep 24 (MP Biomedicals), aplicando un ciclo de 30 segundos a una velocidad de 5,5 m/s. Se centrifugó a 12.500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido se sometió a una purificación adicional con 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). La mezcla se agitó durante 5-10 s, se repitió la

centrifugación en idénticas condiciones y se recogió el sobrenadante. La precipitación de los ácidos nucleicos se realizó añadiendo 50 µl de acetato de sodio (3M) y 500 µl de isopropanol frío. Para estimular la precipitación se agitó suavemente, se incubó a -20°C durante 15 minutos y se centrifugó a 12.500 rpm durante 30 minutos. El precipitado se lavó con etanol (70%) y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se disolvió en 80 µl de agua ultra pura estéril y se cuantificó la concentración de ADN y ARN resultante utilizando un equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad de los ácidos nucleicos extraídos también se evaluó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1% p/v), como se detalla en el capítulo 2. Una alícuota de 50 µl del producto de la extracción se utilizó para la purificación del ARN, el resto se conservó a -80°C hasta su utilización en el análisis del ADN.

Para el aislamiento del ARN, en primer lugar se procedió a eliminar el ADN utilizando la enzima “RNase-Free DNase” (Quiagen GmbH). Para ello, se ajustó la mezcla de reacción a 200 µl: 50 µl del extracto de ácidos nucleicos, 20 µl del tampón de reacción RDD (suministrado con la enzima), 5 µl de la enzima ADNsa y 125 µl de agua ultra pura libre de ARNsa. La reacción enzimática se llevó a cabo incubando la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se purificó el ARN empleando el “RNeasy Minielute Cleanup Kit” (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante, recuperando el ARN puro en 14 µl de agua ultra pura libre de ARNsa. La calidad del ARN obtenido se evaluó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1% p/v).

Para el análisis de las comunidades fúngicas metabólicamente activas, presentes en el ARN, fue necesaria la síntesis del ADN complementario (ADNc) mediante la retro-transcripción catalizada por la enzima “SuperScript II Reverse Transcriptase” (Invitrogen Life Technologies). Para ello, se siguió el protocolo detallado por el fabricante, utilizando el cebador ITS4 (White y col. 1990) para garantizar la síntesis del ADNc de las regiones ITS, como describieron Anderson y Parkin (2007).

Amplificación por PCR

La amplificación por PCR de las regiones ITS del ADN ribosómico se llevó a cabo utilizando los cebadores ITS1 e ITS4 (White y col. 1990), siguiendo las condiciones detalladas en el capítulo 2. Para cada reacción, como ADN molde se añadió unos 10-20 ng de extracto de ADN, mientras que para el análisis del ARN, se añadió 1-2 μ l de una dilución 1:10 del ADNc obtenido.

Los resultados de las reacciones de PCR se comprobaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1% p/v) y los productos amplificados se purificaron usando el kit JETquick Spin (Genomed), y conservados a -20°C hasta su uso en los análisis DGGE y la construcción de genotecas.

Para el análisis por DGGE, fue necesaria una segunda PCR sobre el producto amplificado de las regiones ITS. Los cebadores utilizados fueron el ITS1-GC (contiene una cola rica en GC de 37 bases en su extremo 5') y el ITS2 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3') (White y col. 1990), que amplifican la región ITS1, con una longitud aproximada de unos 200 pb. La composición de la mezcla de reacción fue idéntica a la utilizada con los otros cebadores (capítulo 2), utilizando como ADN molde 1 μ l del producto de PCR purificado de las regiones ITS. El protocolo de PCR utilizado fue el descrito por Michaelsen y col. (2006), compuesto por los siguientes pasos: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C; 35 ciclos compuestos por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C, y 1 minuto a 72°C; seguidos de 10 minutos de extensión final a 72°C. La amplificación de cada muestra analizada se confirmó por electroforesis horizontal en geles de agarosa (1% p/v).

Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

La técnica de DGGE ha sido ampliamente utilizada para caracterizar las comunidades de bacterias y hongos presentes en muestras naturales de origen diverso. Esta técnica es especialmente útil en el estudio de la

microbiota de cuevas, debido a la esperable baja diversidad de estos ambientes oligotrofos. Recientemente, Jurado y col. (2010) aplicó esta técnica al seguimiento de las comunidades responsables de un brote fúngico en la cueva de Castañar de Ibor, Cáceres, España.

Esta técnica permite separar los productos de PCR que tienen tamaños parecidos o idénticos, en base a las diferencias mínimas que presentan sus secuencias, incluso se ha demostrado que esta técnica permite distinguir diferencias de tan sólo un nucleótido (Muyzer y col. 1993, Muyzer y Smalla 1998). La separación de los fragmentos está basada en la reducción de su movilidad electroforética al desnaturalizarse parcialmente la doble cadena de ADN en un gel de poliacrilamida con un gradiente químico de urea y formamida. Por ello, es necesario que los productos de PCR que se analizan incluyan una cola rica en GC en alguno de los cebadores, lo cual aporta estabilidad a la doble cadena evitando su completa desnaturalización. El resultado de la DGGE es un patrón de bandas que representa a la comunidad microbiana de la muestra analizada. En teoría, cada banda corresponde a un microorganismo diferente, aunque se ha comprobado que un mismo microorganismo puede desarrollar más de una banda. Esto puede deberse a la variabilidad genética que presenten las distintas copias de la región analizada, y a las condiciones experimentales utilizadas, ya que cuando se aumenta el tiempo del análisis se incrementa la probabilidad de encontrar más de una banda.

La técnica se desarrolló como describió Muyzer y col. (1993), con algunas modificaciones. Se utilizaron geles de 20 x 16 x 0,1 cm que contenían un 8% (p/v) de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) (Bio-Rad) en tampón TAE 0,5X (Tris 20 mM, ácido acético glacial 10 mM, EDTA 0,5 mM), con un gradiente de agentes desnaturalizantes [urea 7M, formamida desionizada 40% (v/v)] de 25-45%, que resultó ser el rango más adecuado para caracterizar las comunidades fúngicas en estudios anteriores (Jurado y col. 2010). Para generar este gradiente, se prepararon independientemente dos soluciones de acrilamida con distintas concentraciones de agentes desnaturalizantes (25 y 45%), éstas se vertieron en el molde utilizando el

equipo “Gradient Delivery System 475” (Bio-Rad) que posibilita la creación de un gradiente homogéneo. La zona superior del gel, donde se sitúan los pocillos para cargar las muestras, se completó con una solución de acrilamida sin agentes desnaturalizantes.

La polimerización de los geles se catalizó añadiendo a cada una de las soluciones, antes de ser vertida, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (0,7 µl/ml en zona con gradiente desnaturalizante, 0,5 µl/ml en la zona superior sin agente desnaturalizante) y una solución al 10% de persulfato amónico (APS) (5 µl/ml en zona con gradiente desnaturalizante, 3,5 µl/ml en la zona superior sin agente desnaturalizante). Una vez preparado el gel, se mantuvo dos horas a temperatura ambiente hasta su completa polimerización.

La electroforesis se realizó en tampón TAE 0,5X utilizando el equipo de electroforesis vertical D-Code System (Bio-Rad), conectado a una fuente de alimentación Consort E-865 (Consort NV). Antes de cargar las muestras, los geles ya polimerizados se sometieron durante 20 minutos a las condiciones electroforéticas determinadas para estos experimentos (“pre-run”): 60°C de temperatura y 100 V de voltaje. Tras ello, se cargaron las muestras a analizar, que consistieron en 20 µl del producto amplificado con los cebadores ITS1-GC/ITS2 mezclados con 5 µl de tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl 50, sacarosa 0,25 g/ml, azul de bromofenol 1 g/l, SDS 5 mg/ml). La electroforesis de las muestras se realizó durante 16 horas a las condiciones anteriormente detalladas (60°C, 100 V), descritas por Jurado y col. (2010).

Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (10 µg/ml) durante cinco minutos seguidos de un lavado en agua destilada durante un minuto. Los geles se observaron con un transiluminador EX-26.MX (Vilber Lourmat) que emite luz U.V. a 312 nm de longitud de onda. Las imágenes de los geles se captaron con un equipo Kodak EDAS-290 (Kodak) utilizando el programa “Kodak 1D v. 3.5.4. Imaging Scientific System” (Kodak).

De acuerdo con los resultados de DGGE obtenidos al analizar las cepas de hongos aisladas de la cueva de Lascaux, se seleccionaron algunos de éstos para ser utilizados como marcadores de migración en los posteriores análisis DGGE de las muestras naturales. El uso de estos marcadores hizo posible la comparación de los resultados obtenidos en distintas electroforesis, y la identificación aproximada de algunas de las bandas.

Tras obtener los patrones DGGE de las muestras naturales, algunas de las bandas relevantes se secuenciaron con el objeto de identificar los hongos a los que pertenecían. Para ello, éstas se recortaron del gel utilizando un escalpelo estéril, se purificó su ADN utilizando el “QIAEX II Gel Extraction Kit” (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se reamplificó el fragmento de ADN por PCR utilizando los cebadores universales ITS1 e ITS2 (White y col. 1990), se purificó el producto de la PCR y se secuenció. La metodología seguida para cada uno de estos análisis fue idéntica a la detallada para el estudio de las regiones ITS de las cepas de *Ochroconis* (capítulo 2). La identificación se efectuó comparando la secuencia obtenida con las depositadas en GenBank (utilizando el algoritmo BLAST del NCBI) y con aquellas pertenecientes a las distintas cepas de hongos aisladas.

En aquellas muestras en las que se construyeron genotecas, sus perfiles DGGE también se compararon con los generados por los clones representativos de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) mayoritarias. Con ello se pretendió identificar con mayor precisión las principales comunidades presentes en estas manchas negras.

Construcción de genotecas

Con el objeto de identificar las principales comunidades fúngicas de las muestras de manchas negras seleccionadas, se construyeron genotecas a partir de los productos de PCR purificados de las regiones ITS. Para la clonación se utilizó el vector pGEM T-Easy (Promega), siguiendo las

instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. La ligación del fragmento amplificado en el interior del vector se realizó en tubos de 200 µl, en un volumen de reacción de 12 µl, compuesto por el tampón de ligación 2X (6 µl), el vector pGEM T-Easy (1 µl = 50 ng), el producto de PCR purificado (5 µl) y la enzima T4 DNA ligasa (1 µl = 3 unidades Weiss). Las reacciones se incubaron toda la noche a 4°C.

El vector con el fragmento ya ligado en su interior se utilizó para transformar las células competentes de *Escherichia coli* “One Shot Max Efficiency DH5α-T1” (Invitrogen Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunos cambios. Las células competentes (30 µl) se pusieron en contacto con el vector ya ligado (4 µl) y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Tras ello, se sometió a un choque térmico de 30 segundos a 42°C y se pasó a hielo. Se añadieron 250 µl de medio de cultivo SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, glucosa 20 mM, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM) y se incubó durante 1,5 horas en posición horizontal a 37°C y agitación a 250 rpm. A continuación, todo el contenido del tubo se dividió en tres alícuotas (dos de 100 µl y una de 80 µl) que fueron distribuidas homogéneamente con un asa de Drigalski sobre placas de medio Luria Bertani (LB) (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, agar bacteriológico 20 g/l; pH 8) con ampicilina (Amp., 100 mg/l), isopropil tio-β-galactosidasa (IPTG, 0,5 mM) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (Xgal, 80 mg/l). El IPTG es un inductor de la β-galactosidasa y el Xgal es un indicador de las células que expresan esta enzima. El Xgal se hidroliza por la β-galactosidasa produciendo galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol, que se oxida a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul insoluble.

La células competentes de *E. coli* inicialmente son sensibles a la ampicilina y no pueden producir la enzima β-galactosidasa. El vector plasmídico pGEM T-Easy porta, entre otros, el gen *lacZα* que sintetiza la enzima β-galactosidasa, y los genes de resistencia a algunos antibióticos como la ampicilina. Por ello, una vez transformadas, las células de *E. coli* portan el plásmido que las convierte en resistentes al antibiótico y capaces

de producir la enzima, pero, cuando se liga una secuencia en el plásmido hay que tener en cuenta que se coloca específicamente en el marco de lectura del gen *lacZα* interrumpiendo la síntesis de la β-galactosidasa. Por lo tanto, las células transformadas con un plásmido que incluye un inserto serán resistentes a la ampicilina pero siguen sin poder sintetizar la enzima.

Tras 16-24 horas de incubación a 37°C, todas las colonias crecidas en las placas fueron resistentes a la ampicilina, lo que indicaba que fueron transformadas por el vector. Sin embargo, se distinguieron dos tipos de colonias: las de color azul, que tenían el gen *lacZα* funcional debido a que habían adquirido el plásmido sin el inserto, y las de color blanco, que eran las que nos interesaban pues presentaban el inserto en el interior del plásmido.

Tras la incubación de las placas, se seleccionaron al azar aproximadamente 120-130 clones, siempre que fue posible alcanzar este número, escogiendo sólo aquellas colonias de color blanco bien diferenciadas del resto. Éstas se transfirieron a nuevas placas de LB-Amp-IPTG-Xgal utilizando palillos de madera previamente esterilizados. Se incubaron toda la noche a 37°C hasta obtener suficiente biomasa para los análisis y confirmar el color blanco de sus colonias. De éstas, se seleccionaron 104 colonias para llevar a cabo los correspondientes análisis; el número de clones que finalmente se analizó pudo variar en algunas de las muestras en función de los resultados que se fueron obteniendo. La biomasa de cada uno de los clones se transfirió a dos tubos con distinto contenido. Uno de ellos, con 100 µl de agua ultra pura estéril, se utilizó como ADN molde en el ensayo de PCR realizado para verificar la presencia del inserto; y el otro, con 100 µl de de caldo LB-Amp, para el cultivo previo a su conservación y envío al servicio de secuenciación.

Se llevó a cabo el análisis por PCR de cada uno de los clones utilizando los cebadores T7 promotor (T7) (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') y M13 Reverso (M13R) (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') (Ausubel y col. 2003), específicos de la secuencia del vector, que amplificaron la secuencia completa del inserto y parte del vector por los

extremos. Con este análisis se pudo confirmar si los clones poseían el plásmido y si éste en su interior presentaba el inserto del tamaño esperado, de aproximadamente 500-600 pb para las regiones ITS. Por lo tanto el fragmento amplificado debía tener una longitud aproximada de unos 700 pb. La composición de la mezcla de reacción fue idéntica a la utilizada con otros cebadores (capítulo 2), utilizando como ADN molde 1 µl de la suspensión acuosa del clon a analizar. El protocolo de PCR utilizado estuvo compuesto por los siguientes pasos: 3 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; 35 ciclos compuestos por 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 55°C y 2 minutos a 72°C; seguidos de 10 minutos de extensión final a 72°C. La amplificación de cada muestra analizada se comprobó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1% p/v).

Los clones cultivados en caldo LB-Amp, tras toda la noche a 37°C, se dividieron en dos alícuotas de 50 µl y se añadió a cada una de ellas 50 µl de glicerol al 80%. Una se conservó a -80°C y la otra se envió a la empresa Macrogen (Seul, Korea) para la purificación del plásmido y la secuenciación del inserto. Cada uno de los clones se secuenció con el cebador ITS1 empleando el secuenciador capilar “3730xl DNA Analyzer” (Applied Biosystems).

Análisis de secuencias: clasificación en OTUs e identificación

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit 7.0.5.3. (Hall 1999). Para comprobar su calidad se observaron sus cromatogramas y se corrigieron manualmente las posiciones indeterminadas por el secuenciador automático. Para cada una de las secuencias, se detectó la posición del inserto y se eliminaron las regiones correspondientes al vector de clonación. Aquellas secuencias que eran demasiado cortas (< 300 nucleótidos) o cuyo cromatograma mostraba baja calidad se eliminaron directamente.

Las secuencias obtenidas se analizaron en busca de posibles estructuras quiméricas, constituidas por fragmentos de ADN que proceden

de al menos dos microorganismos distintos. Estos artefactos son generados durante la amplificación por PCR. Para detectarlos se utilizó la aplicación “Chimera Test” incluida en la web del Proyecto de Metagenómica Fúngica de la Universidad de Alaska, Fairbanks (<http://www.borealfungi.uaf.edu>), que extrae de cada secuencia las regiones ITS1 e ITS2 y compara los resultados BLAST obtenidos con cada una de ellas por separado. Las secuencias detectadas como posibles quimeras se excluyeron de los análisis.

Las secuencias se alinearon con la aplicación Muscle (Edgar 2004), incluida en la web del EMBL-EBI. La matriz de distancias se elaboró con la aplicación DNA Dist incluida en el programa Phylip 3.63 (Felsenstein 1993). En base a la matriz resultante, las secuencias de los clones se clasificaron en unidades taxonómicas operacionales (OTUs), utilizando el programa Dotur (Schloss y Handelsman 2005). Estas clasificaciones se realizaron empleando el algoritmo “Furthest Neighbor”, considerando valores de similitud comprendidos entre el 90 y 100%. Tras analizar las distintas genotecas construidas, el valor de similitud más representativo resultó ser el 95%, pues a valores superiores se incrementó notablemente el número de OTUs sin aportar ninguna información taxonómica adicional. Es decir, los nuevos OTUs que se generaron, por lo general, estuvieron compuestos por una sola secuencia (“singletons”) y cuando se comprobó su identificación taxonómica ésta resultó ser idéntica a la de otros OTUs ya existentes.

Además, se construyeron las respectivas curvas de rarefacción para cada una de las muestras analizadas, con el fin de estimar el grado de cobertura de los clones analizados con respecto a la diversidad esperable de la comunidad fúngica total. Estas curvas se obtuvieron representando el número de clones procesados frente al número de OTUs que se generaron.

Para cada OTU descrito se seleccionó un clon representativo, éste se volvió a secuenciar con el cebador ITS4 con el objeto de confirmar la secuencia original, inicialmente obtenida secuenciando con el cebador ITS1. Las secuencias consenso se depositaron en las bases de datos nucleotídicas (GenBank), utilizando la aplicación del ENA incluida en el EMBL-EBI.

Para determinar la identificación taxonómica de cada OTU, se analizó la similitud entre la secuencia del clon representativo y todas las presentes en GenBank, utilizando el algoritmo BLASTn (Altschul y col. 1990) del NCBI. Los resultados obtenidos se contrastaron utilizando el algoritmo BLAST de la web del “Fungal Metagenomics Project”, anteriormente mencionada, el cual compara la secuencia introducida con una base de datos restringida a secuencias ITS de hongos. Siempre que fue posible, la identificación taxonómica se concretó a nivel de género, sin embargo, en mucho de los casos sólo fue posible concretar niveles taxonómicos superiores.

Aislamientos en medios de cultivo

Muestras analizadas

Inicialmente, con el objeto de aislar los hongos y bacterias más abundantes, se analizaron tres muestras de manchas con distinta coloración recogidas el 17 de febrero de 2010 (Tabla 15, Fig. 26). Una mancha de color negro (M2), una de color negro-rosa (M3), y otra de color verde-amarillo (M7).

Posteriormente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización molecular, se realizó un muestreo adicional de manchas en febrero de 2011, para llevar a cabo nuevos aislamientos de un modo más minucioso. El objetivo de éstos fue determinar cuáles eran los hongos más abundantes, centrando la atención en aquellas colonias melanizadas de lento crecimiento que podrían corresponder a los grupos de mayor interés, especies de *Ochroconis* y “levaduras negras”. Se recogieron manchas de cuatro de los puntos seleccionados en muestreos anteriores (M1, M3, M6 y M8; Tabla 15). Adicionalmente, se recogió una muestra de mancha negra con forma circular (M9), también sobre sustrato arcilloso, localizada en la base de la pared derecha del Ábside superior (Tabla 15).

Tabla 15. Muestras de manchas de la cueva de Lascaux utilizadas en los aislamientos en medios de cultivo.

Manchas ^a	Características ^a	Localización ^a	Fecha ^a	Aislamientos	
				Hongos Bacterias abundantes	Hongos melanizados ^b
M2	Negra, homogénea, arcilla	Pasaje	17/2/10	X	
M3	Negra-rosa, arcilla	Pasaje	17/2/10	X	
M7	Verde-amarillo, arcilla	Nave	17/2/10	X	
M1	Negra, homogénea, arcilla	Pasaje	1/2/11		X
M3	Negra-rosa, arcilla	Pasaje	1/2/11		X
M6	Negra, forma circular, arcilla	Ábside	1/2/11		X
M8	Negra, homogénea, húmeda, arcilla	Sala de los Toros	1/2/11		X
M9	Negra, forma circular, arcilla	Ábside	1/2/11		X

^a: Todos los datos sobre las muestras analizadas aparecen detallados en la Tabla 13 del capítulo 2, excepto los que conciernen a la mancha M9, que sólo se utilizó en estos análisis.

^b: Aunque se prestó especial atención a los hongos melanizados de lento crecimiento, también se aislaron otros hongos que no presentaban estas características pero eran abundantes.

Se recogieron aproximadamente 100-150 mg de cada muestra en tubos Eppendorf de 1,5 ml, utilizando un escalpelo estéril. Los tubos se mantuvieron en frío hasta la llegada al laboratorio, donde las muestras se procesaron lo antes posible.

Aislamientos

Las muestras se homogenizaron en un mililitro de una solución estéril de Tween 80 al 0,01%, y se realizaron cuatro diluciones decimales seriadas (10^{-1} - 10^{-4}). Se sembraron 100 µl de cada dilución en placas que contenían

distintos medios de cultivo, con la ayuda de un asa de Drigalski estéril. Las muestras recogidas en febrero de 2010 se cultivaron en TSA (triptona de soja 30 g/l, agar 20 g/l) para el aislamiento de bacterias, y en MEA y dicloran rosa bengala cloranfenicol agar (DRBC) (Merk) para el aislamiento de hongos. Las muestras recogidas en febrero de 2011 se cultivaron sobre DCRB y eritritol cloranfenicol agar (ECA) (“yeast nitrogen base” 1X, meso-eritritol 10 g/l, cloranfenicol 0,5 g/l, agar 25 g/l) (Wollenzien y col. 1995), ambos medios de cultivo selectivos habitualmente se usan para el aislamiento de “levaduras negras”.

Las placas se incubaron a 15°C durante dos meses, permitiendo el desarrollo de los hongos de lento crecimiento. Se revisaron periódicamente, aislando en cultivo puro los hongos y bacterias relevantes que fueron apareciendo. Estas cepas se conservaron y se intentó su identificación llevando a cabo los correspondientes análisis moleculares de sus secuencias de ADN ribosómico.

Para los hongos, se analizaron sus regiones ITS, siguiendo las metodologías detalladas en el capítulo 2 (extracción de ADN, PCR y análisis de secuencias). En el caso de las bacterias, los métodos empleados fueron prácticamente idénticos, exceptuando que el marcador estudiado fue una región del gen ribosómico 16S, amplificada utilizando los cebadores 616F (5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3') [posiciones 27-46 en el gen 16S de *Escherichia coli*; Snaird y col. (1997)] y 1510R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') [posiciones 1492-1510 en el gen 16S de *E. coli*; Lane (1991)]. El protocolo de PCR utilizado para este marcador estuvo compuesto por los siguientes pasos: 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C; 35 ciclos compuestos por 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 55°C, y 2 minutos a 72°C; seguidos de 10 minutos de extensión final a 72°C.

Todas las secuencias nucleotídicas obtenidas, en las cuales se basan las identificaciones, se depositaron en la base de datos de GenBank.

Identificación y caracterización de hongos relevantes

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los anteriores apartados: caracterización molecular de las comunidades fúngicas y aislamiento en medios de cultivo, se puso de manifiesto la presencia de determinados hongos que pudieran ser relevantes por su abundancia en las manchas negras. Este apartado centra la atención en ellos, tratando de concretar su identificación al nivel de especie y caracterizando distintas propiedades que pudieran ser importantes en su asociación con el fenómeno de las manchas negras.

Identificación morfológica

Para confirmar la identificación de las principales especies de hongos encontradas se llevó a cabo un estudio morfológico de algunas de las cepas aisladas. Macroscópicamente, se caracterizó la apariencia de las colonias desarrolladas en distintos medios de cultivo, así como, se estudiaron las características microscópicas de su micelio y estructuras de reproducción.

Las cepas se cultivaron en placas de MEA y PDA, que se incubaron a 24°C durante 3 meses y se describió la morfología de las colonias desarrolladas. Cuando éstas desarrollaron abundantes estructuras maduras de reproducción se realizaron las preparaciones microscópicas. El micelio teñido con lacto-fucsina se observó directamente con un microscopio óptico Axioskop 2 (Carl Zeiss).

Las características morfológicas observadas se compararon con las descritas en la bibliografía taxonómica, concretando la identificación a nivel de especie, siempre que fue posible.

Relaciones filogenéticas de “levaduras negras”

Diversas especies de la familia Herpotrichiellaceae, a la que pertenecen las principales “levaduras negras”, resultaron ser los hongos más abundantes en las manchas de la cueva de Lascaux de acuerdo con la

caracterización molecular de las comunidades fúngicas. Por ello, para concretar la posición taxonómica de estos aislamientos, se establecieron las relaciones filogenéticas basadas en el análisis de las regiones ITS. Se incluyeron en el análisis las secuencias de los clones representativos de los OTUs, de las cepas aisladas, y aquellas de GenBank que pertenecen a los homólogos más cercanos, eligiendo, siempre que fue posible, las secuencias de especies tipo.

El alineamiento múltiple se realizó utilizando la aplicación Muscle (Edgar 2004) incluida en el EMBL-EBI. A partir de éste, se establecieron las relaciones filogenéticas con el programa Mega 5 (Tamura y col. 2011), utilizando el algoritmo “Neighbour-Joining” (Saitou y Nei 1987), basado en la matriz de distancias del alineamiento en cuestión. El modelo de sustitución empleado fue Kimura-2 parámetros (Kimura 1980). Las posiciones del alineamiento que presentaban “gaps” no se tuvieron en cuenta. Para estimar el peso relativo que tienen cada una de las ramas del árbol, se realizó un análisis “bootstrap” con 1.000 repeticiones. La topología resultante se comparó con la obtenida utilizando dos algoritmos diferentes: Máxima-Probabilidad y Máxima-Parsimonia.

Tolerancia al cloruro de benzalconio

Se evaluó la tolerancia al BC de las distintas cepas seleccionadas siguiendo la metodología detallada en el capítulo 2. Se sembraron por duplicado placas de MEA de 6 cm de diámetro que contenían concentraciones crecientes de BC (100, 500, 1.000, 5.000 y 10.000 mg/l) con discos de 4 mm de diámetro que contenían micelio de colonias en crecimiento activo. Las placas se incubaron en oscuridad durante un mes a 24°C. Tras ello, se midió el crecimiento axial de las colonias y se calculó la tasa media de crecimiento expresada en milímetros por mes (mm/mes), estimando el efecto de las distintas concentraciones de BC sobre el crecimiento del hongo.

Capacidad de utilizar compuestos aromáticos como fuentes de carbono

Se diseñaron distintos ensayos para evaluar las cepas seleccionadas en este capítulo, así como, las cepas holotipo de las dos especies de *Ochroconis* descritas en el capítulo 2 (LX A1 y LX CH40). El objetivo fue conocer la influencia de determinados compuestos aromáticos en el origen y evolución de estas especies.

Se evaluaron tres compuestos aromáticos: el ácido vanílico (AV), que es un ácido fenólico derivado de la degradación de la lignina, el p-toluensulfonato sódico (pTSS) es un detergente que posee una estructura aromática similar al cloruro de benzalconio, y el tolueno es un alquilbenceno frecuentemente utilizado para el aislamiento selectivo de hongos asociados a ambientes ricos en compuestos aromáticos.

Estos ensayos se basaron en el cultivo de las distintas cepas en placas de Czapek agar (solución Czapek adicionando 15 g/l de agar) sin sacarosa como fuente de carbono, al cual se añadía el producto a ensayar como única fuente de carbono. Los compuestos AV y pTSS (Sigma-Aldrich) se incluyeron en el medio de cultivo, mientras que el aporte de tolueno (Panreac) se realizó incubando las placas de cultivo en una atmósfera enriquecida en dicho compuesto en estado gaseoso (Fig. 31).

Se añadieron controles negativos (sin fuente de carbono) y positivos (Czapek agar con sacarosa). Se evaluaron tres concentraciones distintas de AV y pTSS, con un aporte de carbono equivalente a los tres controles positivos de sacarosa (0,01; 0,05 y 0,25%). Estas concentraciones se seleccionaron de acuerdo con los experimentos desarrollados por Hamada y Abe (2009a,b). En el ensayo del tolueno se utilizaron dos controles positivos con sacarosa al 0,25%, uno de ellos se sometió a la atmósfera de tolueno para evaluar el efecto de este compuesto sobre el crecimiento de los hongos. Los medios de cultivo sin fuente de carbono se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Tras ello, cuando su temperatura disminuyó hasta unos 50°C, se añadieron los diferentes productos a ensayar

previamente esterilizados por filtración utilizando un filtro de acetato de celulosa de 0,2 μm de diámetro de poro. A continuación se homogenizó el contenido y se vertieron en placas Petri estériles de 6 cm de diámetro.

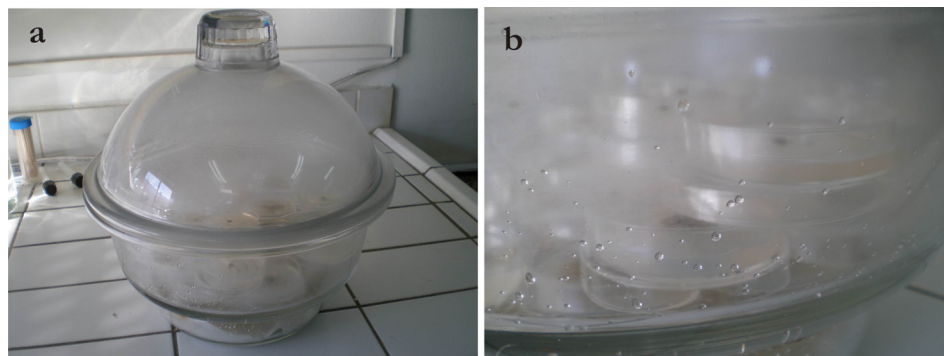


Figura 31. Ensayo diseñado para evaluar la utilización del tolueno, desarrollando una atmósfera hermética en el interior de un desecador (a), donde se cultivan los distintos hongos seleccionados (b).

Para preparar el inóculo fúngico, las cepas seleccionadas se hicieron crecer sobre placas de PDA hasta desarrollar colonias con abundante micelio aéreo, siempre que fue posible. A partir de estas colonias se inocularon los distintos medios de cultivo, traspasando una cantidad mínima de biomasa (algunos conidios y/o fragmentos de hifas) desde la superficie de la colonia. Para ello, se utilizaron palillos de madera previamente esterilizados, evitando la presencia de restos de medio de cultivo en el inóculo. Con cada una de las cepas se sembraron dos placas por tratamiento.

La atmósfera de tolueno se realizó como describe Zhao y col. (2010). Se utilizó un desecador donde se introdujo un vaso de precipitado con 10 ml de una solución de tolueno al 5% (v/v) en dibutilftalato, posibilitando la evaporación gradual de este compuesto en una atmósfera hermética. Se añadieron en el fondo gasas impregnadas con una solución de cloruro sódico (140 g/l) para mantener la humedad relativa del sistema (90%). Las

placas sometidas a la atmósfera de tolueno se incubaron abiertas en el interior del desecador (Fig. 31).

Todos los cultivos se incubaron en oscuridad durante 40 días a 22°C. Tras ello, se estimó el crecimiento de las colonias desarrolladas en presencia de los distintos compuestos evaluados, en relación con el crecimiento basal que tuvieron en el control negativo (sin fuente de carbono).

Resultados y discusión

Caracterización molecular por DGGE

Cepas de hongos

Inicialmente se aplicó esta técnica a distintos aislamientos fúngicos en cultivo puro, con el objeto de conocer el patrón de migración de las distintas especies de *Ochroconis* y *Scolecobasidium* estudiadas en el capítulo 2, así como de otros hongos frecuentemente aislados de la cueva de Lascaux. El gel resultante se muestra en la Figura 32.

Tras analizar por DGGE todas las cepas de *Ochroconis* de la cueva de Lascaux, las 28 cepas de la especie *O. lascauxensis* mostraron un patrón similar compuesto por tres o cuatro bandas. Se diferenciaron tres grupos que coinciden con las mínimas diferencias encontradas en las secuencias de la región ITS1 (capítulo 2). En la Figura 32 se muestran los patrones obtenidos en tres de sus representantes, LX A1, LX CH2 (un nucleótido más) y LX 101R-6 (un nucleótido menos y una diferencia de nucleótido). Estos resultados confirman la elevada sensibilidad de la técnica DGGE. Las cepas de referencia *O. anellii* CBS 284.64 y *S. terreum* CBS 536.69 desarrollaron un patrón muy parecido al de *O. lascauxensis*. Por el contrario, los patrones de migración de *O. anomala* LX CH40, *O. tshanytschae* CBS 100438, *O. constricta* CBS 211.53 y *O. humicola* CBS 116655 fueron diferentes.

Bajo las condiciones experimentales descritas, los patrones de las especies de *Ochroconis* aisladas de la cueva aparecen situados en la zona media-inferior de los geles, sin solaparse con ninguna de las bandas producidas por otros hongos aislados de la cueva (Fig. 32), por lo cual, las condiciones empleadas demostraron ser válidas para caracterizar las comunidades fúngicas de las manchas negras.

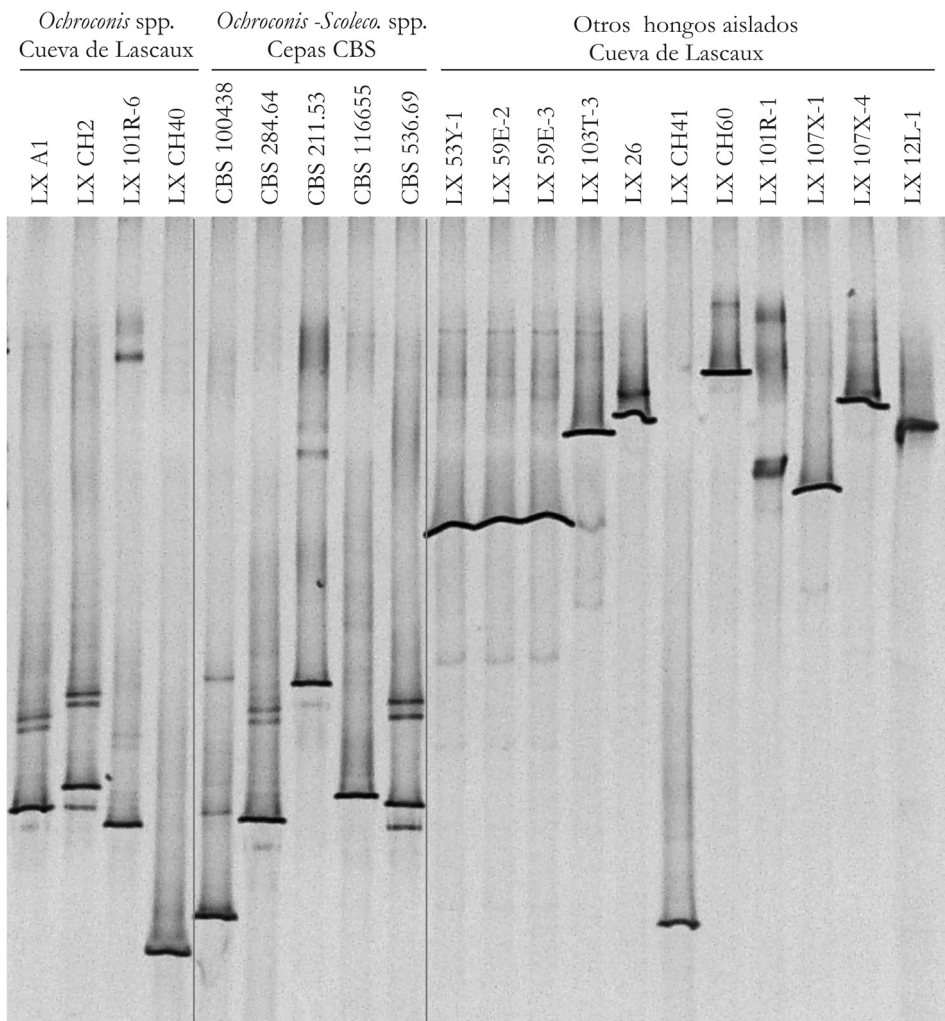


Figura 32. Perfiles DGGE de hongos en cultivo puro. Cepas de *O. lascauxensis* (LX A1, LX CH2 y LX 101R-6) y *O. anomala* (LX CH40). Cepas de referencia: *O. tschamyschae* (CBS 100438), *O. anellii* (CBS 284.64), *O. constricta* (CBS 211.53), *O. humicola* (CBS 116655) y *S. terreum* (CBS 536.69). Otras hongos aislados de la cueva de Lascaux: *Cladosporium* spp. (LX 53Y-1, LX 59E-2 y LX 59E-3), *Geomyces pannorum* (LX 103T-3), *Gliomastix murorum* (LX 26), *Plectosphaerellaceae* sp. (LX CH41), *Exophiala castellanii* (LX CH60), *Mortierella alpina* (LX 101R-1), *Penicillium* sp. (LX 107X-1), *Volutella citrinella* (LX 107X-4) y *Alternaria* sp. (LX 12L-1).

En los posteriores análisis DGGE se utilizaron como marcadores varias combinaciones de estos hongos. El uso de marcadores es imprescindible al analizar muestras naturales, permitiendo comparar los resultados de distintos geles.

La técnica DGGE presentó algunas limitaciones que dificultaron la interpretación de los resultados, ya que determinadas especies de hongos desarrollaron más de una banda, entre ellas *O. lascauxensis* (Fig. 32), y en algunos casos, una misma banda podía contener más de una especie. Por ello, la identificación de los hongos más relevantes se realizó secuenciando las bandas más frecuentes. A pesar de estos inconvenientes, la técnica resultó útil para obtener una aproximación inicial de la composición de las comunidades mayoritarias.

Manchas negras recogidas en 2008 y 2009

Se llevó a cabo un primer estudio de las comunidades fúngicas de las manchas negras mediante análisis DGGE de nueve de las 13 muestras recogidas en 2008 y 2009 (Tabla 12), todas ellas desarrolladas sobre sedimentos arcillosos. Las otras cuatro muestras (A08, A09, C08 y C09) pertenecieron al ensayo de evaluación de tratamientos antifúngicos, llevada a cabo sobre dos manchas negras sobre la roca caliza de la pared izquierda del Pasaje. Los resultados del análisis DGGE de estas cuatro muestras se detallarán posteriormente, con los resultados de las genotecas.

En la Figura 33 se observó que la especie *O. lascauxensis* no se detectó en ninguna de las nueve muestras analizadas, procedentes de diferentes salas de la cueva (Sala de los Toros, Divertículo Axial, Pasaje, Ábside, Nave y Pozo). Sin embargo, por PCR a tiempo real (Fig. 28a), se detectó ADN de este hongo en todas ellas. Esto indica que aún estando presente, *O. lascauxensis* no alcanzó la concentración suficiente para ser detectado por DGGE.

Figura 33. Perfiles DGGE de muestras de manchas negras recogidas en 2008 y 2009. Marcador Mix 1: *E. castellanii* (a), *G. pannorum* (b), *Cladosporium* sp. (c) y *O. anomala* (d). Marcador Mix 2: *V. citrinella* (e), *Penicillium* sp. (f) y *Plectosphaerellaceae* sp. (g). Cepas de *O. lascauxensis* (LXA1, LX CH2 y LX 101R-6).

Por el contrario, en las manchas A08 y C08, antes de limpiar y aplicar los biocidas, *O. lascauxensis* fue el hongo mayoritario de acuerdo con los perfiles DGGE obtenidos. Además, esta identificación se confirmó secuenciando cuatro de las bandas que componían estos patrones. Después de los tratamientos la diversidad fúngica aumentó, apareciendo una serie de bandas comunes en ambas muestras. Cuatro de ellas se identificaron como especies de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Gymnascella* y *Aspergillus*. Además, en C09 sigue apareciendo un patrón similar a *O. lascauxensis*.

Estos resultados concuerdan con las cuantificaciones de *O. lascauxensis* por PCR a tiempo real (Fig. 28a), ya que antes de los tratamientos se registraron valores elevados y después de ellos se detectaron niveles muy inferiores. Es decir, en las muestras A09 y C09 seguía habiendo *O. lascauxensis* pero no se pudo detectar claramente por DGGE.

En la Figura 33 se observa que las comunidades fúngicas de las manchas recogidas entre 2008 y 2009 son bastante variables entre sí, sin embargo cabe destacar algunas similitudes entre ellas. En al menos seis de las nueve manchas se observa una banda en la zona inferior del gel cuyo punto de migración coincide con un hongo identificado tentativamente como *Plectosphaerellaceae* sp., incluido en el marcador Mix 2 (g). Al analizar la secuencia ITS de esta cepa, las secuencias de GenBank más próximas resultaron ser: *Acremonium nepalense* (97%) y *Plectosphaerella cucumerina* (96%).

Las tres muestras de la Sala de los Toros (M-LX1, M-LX3 y M-LX6) presentaron un perfil similar con un hongo desconocido claramente predominante. Las muestras del fondo del Divertículo Axial (M-LX10) y de la derecha del Pasaje (M-LX11) mostraron una clara similitud entre sí. Lo mismo ocurrió con las muestras del Pozo (M-LX14 y M-LX15) y del Ábside (M-LX13).

Manchas recogidas en 2010

Se obtuvieron los perfiles de DGGE de las muestras de manchas recogidas en febrero y septiembre de 2010 (M1-M8). Además de seis manchas de color negro, se analizó una muestra de color negro-rosa (M3) y otra de color verde-amarillo (M7), todas ellas sobre el sustrato arcilloso.

De los resultados obtenidos (Fig. 34), en primer lugar cabe destacar que los patrones de bandas en febrero y septiembre fueron muy similares. Las poblaciones de hongos en cada una de las muestras permanecieron estables a lo largo del año de estudio. No aparecieron las bandas características de *O. lascauxensis* en ninguna de las muestras analizadas. A pesar de que en todas las muestras se detectó ADN de este hongo por PCR a tiempo real (Fig. 28b), estas concentraciones fueron indetectables por DGGE al no representar uno de los hongos mayoritarios.

Centrando la atención en las seis muestras de manchas negras, se pudieron distinguir algunas bandas con punto de migración similar. Cinco de estas muestras recogidas del Pasaje (M1, M2 y M4) y del Ábside (M5 y M6) presentaron un patrón característico compuesto por una doble banda débil en zona intermedia (6) y una banda más intensa en la zona inferior (8). Tras secuenciar cuatro de ellas, todas se identificaron como *Plectosphaerellaceae* sp., coincidiendo con las bandas que aparecieron en las manchas recogidas en 2008 y 2009, y con distintas cepas aisladas de la cueva en sucesivos muestreos. Entre ellas, está la que se utilizó como marcador en la Figura 34, Mix 2 (f).

Por otro lado, en cinco de las seis manchas negras (excepto M4) se repitieron unas bandas localizadas en la zona superior del gel (1). Éstas se identificaron como “levaduras negras” de la familia *Herpotrichiellaceae*, cercana a los géneros *Exophiala* o *Cladophialophora*. Además, en la mancha negra-rosa (M3), la principal banda en febrero y septiembre (2) también muestra similitud con estos géneros y con *Capronia* (estado teleomorfo de *Exophiala*).

Las muestras de la mancha verde-amarilla (M7) recogidas de la Nave en las dos épocas del año dieron la misma banda mayoritaria (7). Su secuencia fue similar a *Bullera* sp., levaduras de color amarillo pálido o crema que frecuentemente se encuentran en el aire y en la filosfera.

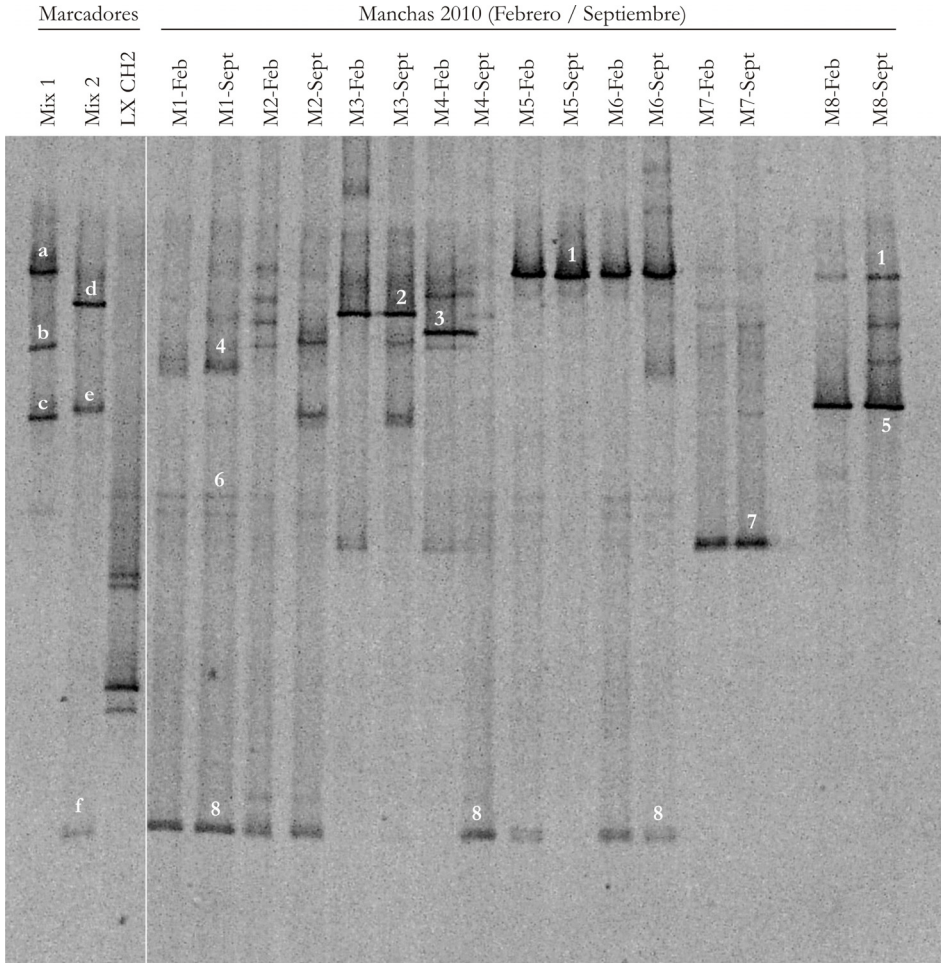


Figura 34. Perfiles DGGE de muestras de manchas (M1-M8) recogidas en febrero (izquierda) y septiembre (derecha) de 2010. Marcador Mix 1: *E. castellanii* (a), *G. pannorum* (b) y *Cladosporium* sp. (c). Marcador Mix 2: *V. citrinella* (d), *Penicillium* sp. (e) y *Plectosphaerellaceae* sp. (f). Cepa control *O. lascauxensis* (LX CH2). Bandas identificadas: “levaduras negras” cercanas a los géneros *Exophiala*, *Capronia* o *Cladophialophora* (1, 2), *G. murorum* (3), *Geomyces* sp. (4), *Chytridiomycete* sp. (5), *Plectosphaerellaceae* sp. (6, 8) y *Bullera* sp. (7).

Para determinar las comunidades de hongos que estaban metabólicamente activos en las manchas, se seleccionaron del muestreo de septiembre tres manchas negras con diferente apariencia (M1, M6 y M8), localizadas en distintas salas, y la mancha negra-rosa (M3). Analizando el ADN se obtuvieron los hongos mayoritarios, independientemente de que estuviesen activos o no. Mientras que con el análisis del ARN, sólo aparecieron las poblaciones de hongos que estaban metabólicamente activas.

En la Figura 35, cada una de las muestras proporcionó perfiles similares al analizar el ADN y el ARN. Sin embargo, se observaron algunas bandas diferentes al compararlos.

Secuenciando algunas de las principales bandas obtenidas en los perfiles de ARN, se confirmó que todas las muestras analizadas presentaron “levaduras negras” de la familia *Herpotrichiellaceae* (1, 3) metabólicamente activas. Además, las muestras de manchas negras M1 y M6 presentaron el hongo identificado como *Plectosphaerellaceae* sp. metabólicamente activo (5). Dada la abundancia de estos hongos en las muestras analizadas, fue necesario profundizar en su estudio para clarificar el papel que juegan en la formación de las manchas negras de la cueva de Lascaux.

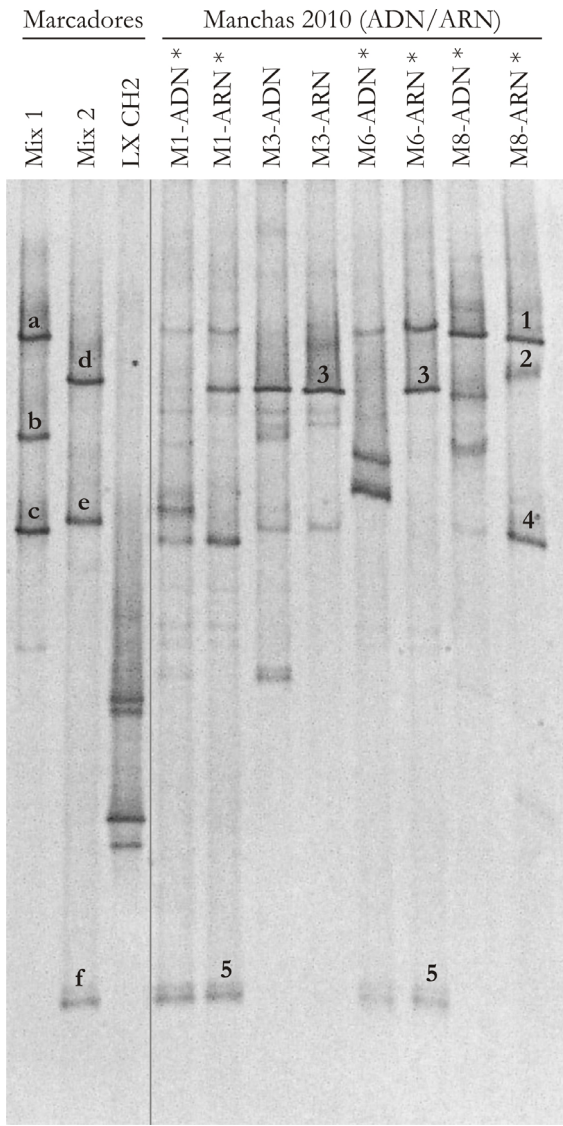


Figura 35. Perfiles DGGE de muestras de manchas negras (M1, M6 y M8) y negra-rosa (M3), recogidas en septiembre de 2010. Análisis comparativo de ADN y ARN (hongos metabólicamente activos). Marcador Mix 1: *E. castellanii* (a), *G. pannorum* (b) y *Cladosporium* sp. (c). Marcador Mix 2: *V. citrinella* (d), *Penicillium* sp. (e) y *Plectosphaerellaceae* sp. (f). Cepa control *O. lascauxensis* (LX CH2). Bandas identificadas: “levaduras negras” cercanas a los géneros *Exophiala*, *Capronia* o *Cladophialophora* (1, 3), Chytridiomycete spp. (2, 4) y *Plectosphaerellaceae* sp. (5). Los asteriscos marcan las muestras que posteriormente se emplearon en la construcción de genotecas.

Muestras de aire recogidas en septiembre de 2010

Las comunidades de hongos presentes en las muestras de aire recogidas en septiembre de 2010 también se analizaron por DGGE (Fig. 36). Los hongos mayoritarios en el aire de las distintas zonas de la cueva variaron sustancialmente. En el exterior de la cueva (A1) se distinguieron las bandas correspondientes a los hongos *Cladosporium* sp. (5) y *Epicoccum nigrum* (7). En la sala SAS2 (A2) el hongo mayoritario correspondió a una especie de ectomicorriza cercana a los géneros *Atheliae* o *Amphinema* (4). En la Sala de los Toros (A3) y el Divertículo Axial (A4 y A5) los perfiles DGGE obtenidos fueron similares, siendo abundante la presencia de *G. pannorum* (2 y 3), hongo frecuentemente aislado de manchas. También apareció la especie mencionada de ectomicorriza (4) y Pleosporales sp. (6). En el perfil DGGE de la muestra del Pasaje (A6), una de las bandas se identificó como *Exophiala* sp. (1), demostrando que las “levaduras negras” presentes en las manchas de esta zona también se dispersaban por el aire. En el Ábside (A7) y la Cámara de los Felinos (A8), los principales hongos presentes en el aire correspondieron a los géneros *Cladosporium* (5) y *Aspergillus* (8 y 9).

En ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de *O. lascauxensis*. Sin embargo, se obtuvieron resultados positivos, por PCR a tiempo real, en cinco de los ocho puntos analizados. Las concentraciones de ADN detectadas estuvieron comprendidas entre los 4,6 pg/m³ en el Pozo (A8) y los 35,3 pg/m³ en el Pasaje (A6), representando el 0,0009 y 0,004% del ADN total. Por lo tanto, este hongo es uno de los grupos minoritarios en el aire de la cueva, y no es de extrañar que no se pudiera detectar por DGGE.

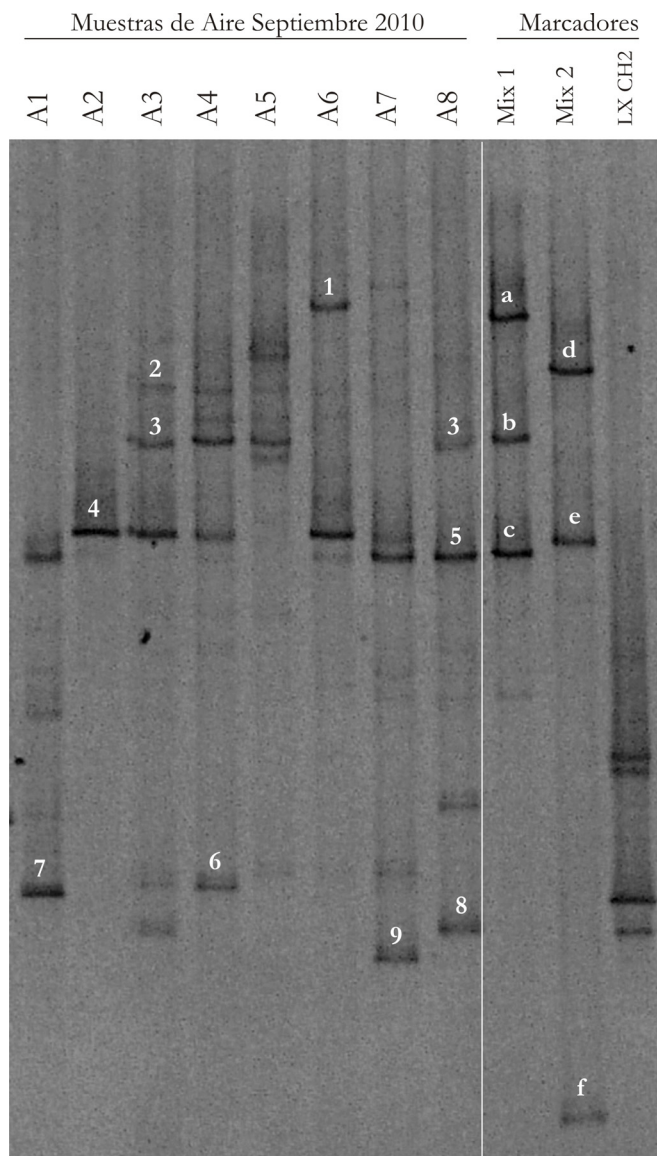


Figura 36. Perfiles DGGE de muestras de aire (A1-A8) recogidas en septiembre de 2010. Marcador Mix 1: *E. castellanii* (a), *G. pannorum* (b) y *Cladosporium* sp. (c). Marcador Mix 2: *V. citrinella* (d), *Penicillium* sp. (e) y *Plectosphaerellaceae* sp. (f). Cepa control *O. lascauxensis* (LXA1). Bandas identificadas: *Exophiala* sp. (1), *Geomyces pannorum* (2, 3), Ectomicorriza cercana a géneros *Atheliae* y *Amphinema* (4), *Cladosporium* sp. (5), Pleosporales sp. (6), *Epicoccum nigrum* (7) y *Aspergillus* spp. (8, 9).

Caracterización molecular por construcción de genotecas

Se profundizó en el estudio de las comunidades fúngicas asociadas a las manchas negras construyendo nueve genotecas, abordando los objetivos anteriormente detallados.

Se secuenciaron un total de 957 clones, a partir de los cuales se obtuvieron 729 secuencias ITS de buena calidad, que se utilizaron para realizar los análisis definitivos de las genotecas.

Se construyeron las curvas de rarefacción al 95% de similitud para cada una de las muestras analizadas (Fig. 37), solamente se alcanzó la fase estacionaria en la curva correspondiente a la muestra C08, mancha negra recogida antes de los tratamientos antifúngicos (Fig. 37a). Su diversidad fúngica fue cubierta analizando únicamente 67 secuencias. Sin embargo, habiendo analizado un número superior de secuencias en el resto de muestras (76-92), ninguna de sus curvas de rarefacción alcanzó la fase estacionaria de un modo claro (Fig. 37a,b). Las curvas de las muestras M1 (ADN y ARN), M6 (ADN y ARN) y M8 (ADN) se aproximaron a la saturación sin alcanzarla totalmente, mientras que las curvas de las muestras de manchas C09 y M8 (ARN), y la muestra de aire A6, se mantuvieron en la fase exponencial.

Estos resultados demostraron que las comunidades fúngicas de las muestras estudiadas son muy diversas. A pesar de esto, el número de clones estudiados resultó ser suficiente para caracterizar de forma fiable las comunidades mayoritarias.

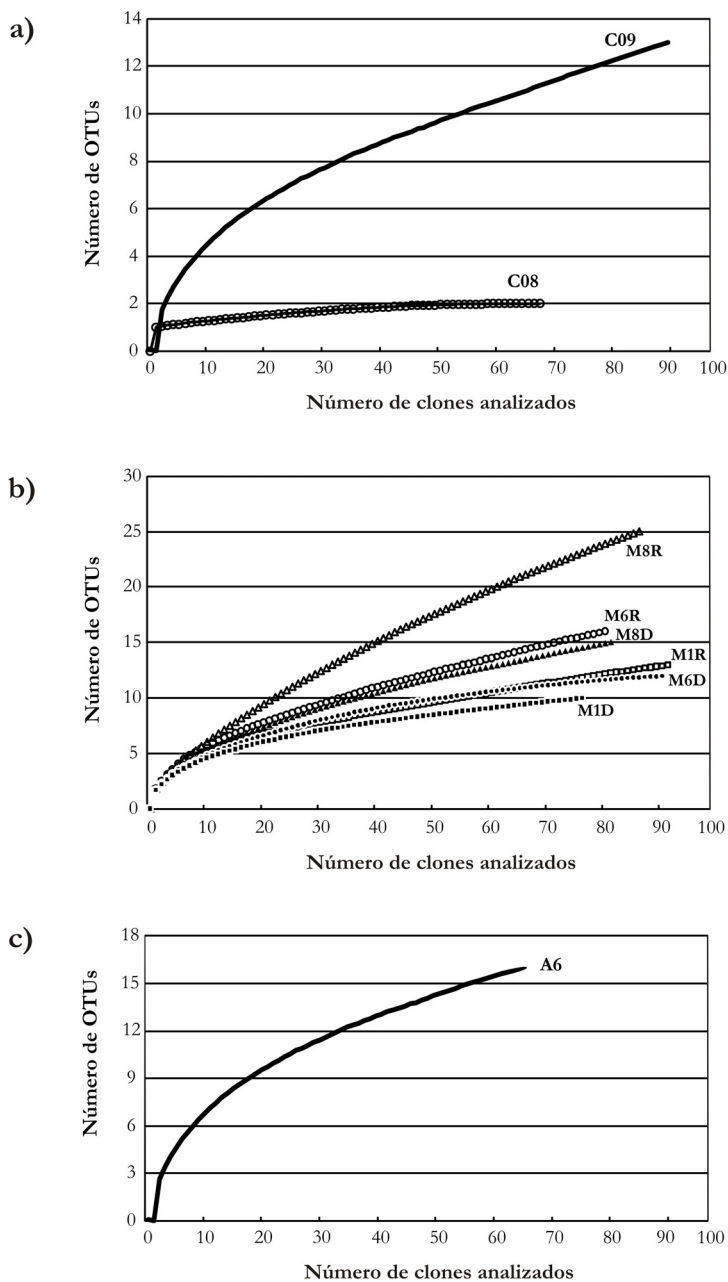


Figura 37. Curvas de rarefacción de las diferentes genotecas construidas. **a.** Mancha negra recogida antes (C08) y después (C09) de los tratamientos antifúngicos, análisis ADN. **b.** Manchas negras recogidas en septiembre de 2010, análisis ADN-ARN. **c.** Muestra de aire recogida del Pasaje en septiembre de 2010, análisis ADN.

Comunidades fúngicas de manchas negras sobre roca caliza. Evaluación de tratamientos antifúngicos

Se analizaron muestras recogidas en 2008 y 2009 de las zonas de estudio A y C del Pasaje, donde se evaluó la eficiencia de los tratamientos de control (limpieza mecánica y biocidas). Los perfiles DGGE se muestran en la Figura 38a.

Las muestras de manchas recogida antes de los tratamientos (A08 y C08) tuvieron un patrón de bandas coincidente con el desarrollado por las dos cepas de *O. lascauxensis* introducidas como marcadores (LX CH2 y LX A1), demostrando que esta especie era dominante en las manchas desarrolladas sobre la roca caliza. Este hecho se confirmó por los resultados obtenidos al analizar la genoteca de la muestra C08 (Tabla 16), compuesta por sólo dos OTUs, uno mayoritario identificado como *O. lascauxensis* con un 100% de identidad (97% de clones), y otro identificado como *Pochonia chlamydosporia* con un 98% de identidad (3% de clones). Estos datos indicaron que *O. lascauxensis* participaba activamente en la formación de las manchas negras que se extendieron por las paredes y bóvedas de roca caliza, entre los años 2006 y 2008. Esta especie ha sido aislada en repetidas ocasiones de éstas y otras manchas similares (Tabla 2).

Después de los tratamientos de limpieza y biocida (A09 y C09), las comunidades fúngicas fueron mucho más diversas, como muestran sus perfiles DGGE y el análisis de las genotecas.

En efecto, la genoteca construida a partir de la muestra tratada con biocidas (C09) mostró cambios notables con respecto a la genoteca inicial. La comunidad fúngica fue mucho más diversa, la proporción de *O. lascauxensis* se redujo considerablemente, pero esta especie continuó representando la mitad de los clones obtenidos, lo que pone en tela de juicio la eficacia de los tratamientos aplicados de acuerdo con lo establecido por Bastian y col. (2009b). En la muestra C09 se detectaron 12 OTUs (porcentaje de clones: 96,6% Ascomycota y 3,4% Basidiomycota), donde *O. lascauxensis* seguía representando el grupo mayoritario con un 52,3% de los

clones analizados, seguido por representantes de los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Rhodotorula* y *Gymnascella*, frecuentemente encontrados en muestras de aire de cuevas (Jurado y col. 2010, Fernandez-Cortes y col. 2011, Porca 2011, Porca y col. 2011).

Los resultados obtenidos para la zona C pueden extrapolarse a la zona A, cercana y sometida a condiciones experimentales similares (limpieza mecánica y biocidas), de acuerdo con sus perfiles DGGE (Fig. 38a). La comunidad fúngica antes de los tratamientos también estuvo dominada por *O. lascauxensis*, y tras ellos, la diversidad aumentó considerablemente adquiriendo una mayor importancia los hongos que se dispersaban por vía aérea.

En las áreas tratadas con biocidas, se eliminó parcialmente *O. lascauxensis* al igual que otros hongos y bacterias, pero posteriormente se produjo una rápida sucesión de comunidades, instalándose otros hongos que debieron llegar a la zona por vía aérea. Estos hongos podrían colonizar rápidamente las áreas tratadas actuando como saprófitos especializados en la descomposición de materia orgánica. Probablemente, la biomasa de los microorganismos muertos y los productos de degradación de los biocidas aportaron la materia orgánica necesaria para el sustento de estos colonizadores secundarios. El resultado final de los tratamientos biocidas fue un incremento de la diversidad fúngica.

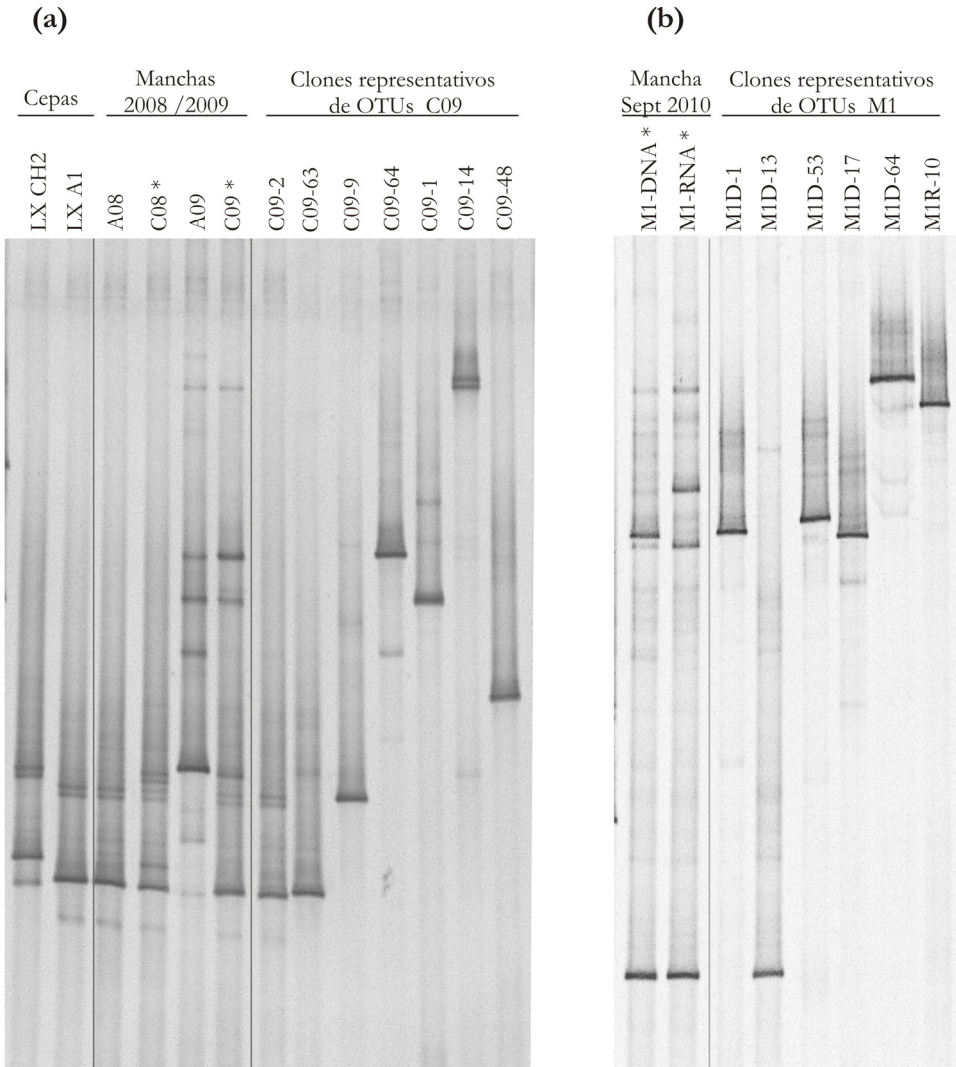


Figura 38. Perfiles DGGE de muestras de manchas negras y clones representativos de OTUs mayoritarios en sus genotecas. **a.** Muestras empleadas en la evaluación de tratamientos antifúngicos. Cepas de *O. lascauxensis* (LX CH2 y LX A1). Clones representativos de la genoteca C09: *O. lascauxensis* (C09-2), *Aspergillus* sp. (C09-63), *Trichoderma* sp. (C09-9), *Cladosporium* sp. (C09-64), *Alternaria* sp. (C09-1), *Rhodotorula* sp. (C09-14) y *Gymnascella* sp. (C09-48). **b.** Mancha negra M1. Clones representativos: *Herpotrichiellaceae* sp. (M1D-1), *Plectosphaerellaceae* sp. (M1D-13), *Exophiala moniliae* (M1D-53), *Chrysosporium* sp. (M1D-17) y *Herpotrichiellaceae* spp. (M1D-64 y M1R-10). Los asteriscos marcan las muestras empleadas en la construcción de genotecas.

Tabla 16. Hongos identificados en la mancha negra del Pasaje-izquierda (C), antes (C08) y después (C09) de la aplicación de los tratamientos biocidas. Las genotecas se construyeron a partir del análisis del ADN y los OTUs se generaron al 95% de similitud.

OTUs (Clones representativos)	Nº Acceso GenBank	Identificación Taxonómica (Filo, Familia, Género)	Secuencia de GenBank más cercana (% identidad)	Nº clones	%
Muestra C08 - 67 clones analizados (81 clones secuenciados)					
C08-1	HE605223	Ascomycota (Mitospóricos), <i>Ochroconis</i>	<i>Ochroconis lascauxensis</i> (100)	65	97
C08-13	HE605224	Ascomycota, Clavicipitaceae, <i>Pochonia</i>	<i>Pochonia chlamydosporia</i> (98)	2	3
Muestra C09 - 88 clones analizados (104 clones secuenciados)					
C09-2	HE605225	Ascomycota (Mitospóricos; <i>inc. sed.</i>), <i>Ochroconis</i>	<i>Ochroconis lascauxensis</i> (100)	46	52,3
C09-63	HE605226	Ascomycota, Trichocomaceae, <i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i> (100)	12	13,6
C09-64	HE605227	Ascomycota, Davidiellaceae, <i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (100)	10	11,4
C09-9	HE605228	Ascomycota, Hypocreaceae, <i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma</i> sp. (99)	8	9,1
C09-1	HE605229	Ascomycota, Pleosporaceae, <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria tenuissima</i> (100)	4	4,5
C09-48 ^a	HE605230	Ascomycota, Gymnoascaceae, <i>Gymnascella</i>	<i>Gymnascella aurantica</i> (93)	3	3,4
C09-14 ^a	HE605231	Basidiomycota, (Mitospóricos; <i>inc. sed.</i>), <i>Rhodotorula</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (99)	2	2,3
C09-28	HE605232	Basidiomycota, Malasseziaceae, <i>Malassezia</i>	<i>Malassezia restricta</i> (99)	1	1,1
C09-51	HE605233	Ascomycota, Cordycipitaceae, <i>Engyodontium</i>	<i>Engyodontium album</i> (99)	1	1,1
C09-103	HE605234	Ascomycota, Cordycipitaceae, <i>Isaria</i>	<i>Isaria farinosa</i> (99)	1	1,1

^a: Agrupa dos OTUs con idéntica identificación taxonómica, pero con porcentaje de identidad inferior al nivel de corte (95%).

Comunidades fúngicas metabólicamente activas en manchas negras de 2010

Se analizaron en paralelo los extractos de ADN y ARN de tres manchas negras desarrolladas sobre el sustrato arcilloso, recogidas en septiembre de 2010: M1, de aspecto homogéneo, localizada en la pared derecha del Pasaje; M6, con forma circular, localizada en la pared izquierda del Ábside superior; y M8, de aspecto homogéneo, localizada en un área de percolación de agua en la Sala de los Toros, esquina que separa el Pasaje y el Divertículo Axial (Fig. 30).

Muestra M1:

Se detectaron nueve OTUs en el análisis de ADN (porcentaje de clones: 96,1% Ascomycota, 2,6% Basidiomycota, 1,3% Zygomycota) y 13 OTUs en el análisis de ARN (porcentaje de clones: 94,6% Ascomycota, 1,1% Basidiomycota, 1,1% Zygomycota, 3,2% otros eucariotas) (Tabla 17).

La mayoría de los clones pertenecieron a la familia Herpotrichiellaceae (64,5% en ADN y 56,5% en ARN), formando cinco OTUs metabólicamente activos. Los tres más abundantes se identificaron como: (1) Herpotrichiellaceae sp., cuyo homólogo más cercano en GenBank fue *Capronia coronata* (90%), representando el 48,7% de los clones en ADN y el 14,1% de los clones en ARN; (2) *Exophiala* sp., cuyo homólogo más cercano fue *E. moniliae* (96%), representando el 9,2% de los clones en ADN y el 29,3% de los clones en ARN; y (3) otra Herpotrichiellaceae sp., cuyo homólogo más cercano fue *Thysanorea papuana* (91%), representando el 6,6% de los clones en ADN y el 9,8% de los clones en ARN.

La banda 3 detectada en el análisis DGGE de las muestras M1, M3 y M6 (Fig. 35) correspondió a la especie de *Exophiala* mencionada.

Tabla 17. Hongos identificados en las manchas negras recogidas en septiembre de 2010 (M1, M6 y M8). Con cada una de las muestras se construyeron genotecas independientes de ADN y ARN. Los OTUs se generaron al 95% de similitud.

OTUs (Clones)	Nº Acceso GenBank Identificación Taxonómica ^a		Secuencia de GenBank más cercana (% identidad)	DNA		RNA	
				Nº clones	%	Nº clones	%
M1-DNA - 76 clones analizados (104 secuenciados) / M1-RNA - 92 clones analizados (156 secuenciados)							
M1D-1	HE605235	Ascomycota, Herpotrichiellaceae	<i>Capronia coronata</i> (= <i>Exophiala</i> sp.) (90)	37	48,7	13	14,1
M1D-13	HE605236	Ascomycota, Plectosphaerellaceae	<i>Acremonium nepalense</i> (97)	17	22,4	22	23,9
M1D-53	HE605237	Ascomycota, Herpotrichiellaceae, <i>Exophiala</i>	<i>Exophiala moniliae</i> (96)	7	9,2	27	29,3
M1D-17	HE605238	Ascomycota, Eurotiomycetidae, <i>Chrysosporium</i>	<i>Chrysosporium pseudomercurarium</i> (97)	5	6,6	9	9,8
M1D-64	HE605239	Ascomycota, Herpotrichiellaceae	<i>Thysanorea papuana</i> (91)	5	6,6	9	9,8
M1D-14	HE605240	Basidiomycota, Agaricostilbomycetidae, <i>Kurtzmanomyces</i>	<i>Kurtzmanomyces tardus</i> (94)	2	2,6		
M1D-82	HE605241	Zygomycota, Mortierellaceae, <i>Mortierella</i>	<i>Mortierella alpina</i> (100)	1	1,3		
M1D-22	HE605242	Ascomycota, Helotiales	<i>Helotiales</i> no cultivable (ectomicorriza) (95)	1	1,3		
M1D-97	HE605243	Ascomycota, Clavicipitaceae, <i>Pochonia</i>	<i>Pochonia chlamydosporia</i> (99)	1	1,3		
M1R-10	HE605244	Ascomycota, Herpotrichiellaceae	<i>Exophiala</i> sp. (99)			2	2,2
M1R-134 ^b	HE605245	Eukaryota, Amoebozoa	<i>Vanella</i> sp. (71), 65% cobertura ^c			2	2,2
M1R-3	HE605246	Ascomycota, Herpotrichiellaceae	<i>Capronia kleinschmidensis</i> (82)			1	1,1
M1R-131	HE605247	Ascomycota, Gymnoascaceae, <i>Gymnascella</i>	<i>Gymnascella aurantica</i> (93)			1	1,1

Tabla 17 (Continuación).

OTUs (Clones)	N° Acceso GenBank	Identificación Taxonómica ^a	Secuencia de GenBank más cercana (% identidad)	DNA		RNA	
				N° clones	%	N° clones	%
M1R-54	HE605248	Zygomycota , Mortierellaceae, <i>Mortierella</i>	<i>Mortierella</i> sp. (98)			1	1,1
M1R-84	HE605249	Basidiomycota	<i>Cryptosporidium</i> no cultivable (94), 37% cobertura ^c			1	1,1
M1R-145	HE605250	Eukaryota, Viridiplantae	<i>Debregeasia elliptica</i> (87)			1	1,1
M6-DNA - 91 clones analizados (104 secuenciados) / M6-RNA - 81 clones analizados (104 secuenciados)							
M6D-7	HE605251	Ascomycota (Mitosporic), <i>Ochroconis</i>	<i>Ochroconis lascauxensis</i> (100)	32	35,2		
M6D-44	HE605252	Ascomycota, Herpotrichiellaceae	<i>Capronia coronata</i> (= <i>Exophiala</i> sp.) (90)	31	34,1	20	24,7
M6D-32	HE605253	Ascomycota, Plectosphaerellaceae	<i>Acremonium nepalense</i> (97)	9	9,9	2	2,5
M6D-66	HE605254	Ascomycota, Herpotrichiellaceae, <i>Exophiala</i>	<i>Exophiala moniliae</i> (96)	4	4,4	20	24,7
M6D-39	HE605255	Ascomycota, Herpotrichiellaceae	<i>Thysanorea papuana</i> (91)	3	3,3	16	19,7
M6D-6 ^b	HE605256	Eukaryota, <i>Amoebozoa</i>	<i>Physarum melleum</i> (85), 35% cobertura ^c	3	3,3	11	13,6
M6D-95	HE605257	Eukaryota	<i>Metazoa</i> no cultivable (82), 35% cobertura ^c	3	3,3	3	3,7
M6D-10	HE605258	Basidiomycota, Erythrobasidiaceae, <i>Rhodotorula</i>	<i>Rhodotorula lamellibrachiae</i> (94)	2	2,2	2	2,5
M6D-56	HE605259	Ascomycota, Hypocreales	<i>Lecanicillium kalimantanense</i> (95)	2	2,2		
M6D-60	HE605260	Ascomycota, Hypocreales	<i>Acremonium</i> sp. (96)	1	1,1		
M6D-68	HE605261	Eukaryota, Viridiplantae	<i>Debregeasia elliptica</i> (87)	1	1,1		
M6R-32 ^b	HE605262	Eukaryota	<i>Physarum melleum</i> (90), 18% cobertura ^d			2	2,5

Tabla 17 (Continuación).

OTUs (Clones)	Nº Acceso		Secuencia de GenBank más cercana (% identidad)	DNA		RNA	
	GenBank	Identificación Taxonómica ^a		Nº clones	%	Nº clones	%
M6R-57	HE605263	Ascomycota, Herpotrichiellaceae, <i>Exophiala</i>	<i>Exophiala castellanii</i> (99)			1	1,2
M6R-96	HE605264	Ascomycota, Herpotrichiellaceae	<i>Exophiala</i> sp. (84)			1	1,2
M6R-9	HE605265	Ascomycota, Teloschistaceae, <i>Caloplaca</i>	<i>Caloplaca teicholyta</i> (99)			1	1,2
M6R-99	HE605266	Ascomycota, Pleosporaceae, <i>Lewia</i>	<i>Lewia infectoria</i> (99)			1	1,2
M6R-43	HE605267	Basidiomycota	<i>Exidiopsis grisea</i> (92), 39% cobertura ^c			1	1,2
M8-DNA - 82 clones analizados (104 secuenciados) / M8-RNA - 87 clones analizados (104 secuenciados)							
M8D-2	HE605268	Ascomycota, Herpotrichiellaceae	<i>Capronia kleinmondensis</i> (82)	34	41,5	15	17,2
M8D-1	HE605269	Eukaryota	Eucariota no cultivable (99)	16	19,5		
M8D-7	HE605271	Eukaryota	<i>Prunus avium</i> (100), 13% cobertura ^d	9	11	37	42,5
M8D-28 ^b	HE605272	Eukaryota	<i>Apedinella radians</i> (90), 29% cobertura ^c	9	11	5	5,7
M8D-12 ^b	HE605273	Ascomycota, Herpotrichiellaceae, <i>Exophiala</i>	<i>Capronia coronata</i> (= <i>Exophiala</i> sp.) (99)	7	8,5	2	2,3
M8D-80 ^b	HE605274	Eukaryota, Amoebozoa	<i>Platyamoeba</i> sp. (86), 32% cobertura ^c	2	2,4	4	4,6
M8D-35	HE605275	Fungi	Hongo no cultivable (95)	1	1,2	2	2,3
M8D-65	HE605276	Ascomycota, Pleosporaceae, <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria alternata</i> (100)	1	1,2		
M8D-37	HE605277	Ascomycota, Hypocreales	<i>Acremonium furcatum</i> (98)	1	1,2		
M8D-50	HE605278	Ascomycota, Myxotrichaceae, <i>Geomyces</i>	<i>Geomyces pannorum</i> (99)	1	1,2		
M8R-4 ^b	HE605279	Eukaryota	Eucariota no cultivable (92)			8	9,2

Tabla 17 (Continuación).

OTUs (Clones)	N° Acceso GenBank	Identificación Taxonómica ^a	Secuencia de GenBank más cercana (% identidad)	DNA		RNA	
				N° clones	%	N° clones	%
M8R-8 ^b	HE605280	Fungi	Hongo no cultivable (92)			6	6,9
M8R-16	HE605281	Ascomycota, Gymnoascaceae, <i>Gymnascella</i>	<i>Gymnascella aurantica</i> (93)			2	2,3
M8R-104	HE605282	Eukaryota	Eucariota no cultivable (88), 23% cobertura ^c			1	1,1
M8R-89	HE605283	Eukaryota	<i>Sphaerotbecum destruens</i> (93), 45% cobertura ^c			1	1,1
M8R-50	HE605284	Ascomycota, Hypocreales	<i>Acremonium</i> sp. (96)			1	1,1
M8R-60	HE605285	Basidiomycota	Basidiomycete sp. (81), 22% cobertura ^c			1	1,1
M8R-71	HE605286	Eukaryota, Amoebozoa	<i>Physarum melleum</i> (91), 31% cobertura ^c			1	1,1
M8R-5	HE605286	Fungi	Hongo no cultivable (87), 21% cobertura ^c			1	1,1

^a: La identificación taxonómica concretó filo, familia y género siempre que fue posible. Sin embargo, en muchos casos sólo fue posible concretar niveles taxonómicos superiores.

^b: Agrupa varios OTUs (de ADN y/o ARN) con idéntica identificación taxonómica, pero con porcentaje de identidad inferior al nivel de corte (95%).

^c: Cobertura del alineamiento BLAST localizada en el gen ribosómico 5.8S.

^d: Cobertura del alineamiento BLAST localizada en el gen ribosómico 28S.

El hongo Plectosphaerellaceae sp., frecuentemente detectado en los análisis DGGE de manchas negras recogidas en distintos años (2008-2010), también se encontró metabólicamente activo en las genotecas de M1, representando el 22,4% de los clones en ADN y el 23,9% en ARN. La secuencia ITS de este OTU fue idéntica a las cepas anteriormente aisladas y a las bandas DGGE secuenciadas, siendo su homólogo más cercano *Acremonium nepalense* (97%). Por el contrario, no se detectó ningún clon de *O. lascauxensis*, lo cual coincidió con los resultados obtenidos por DGGE.

También fue significativa la detección de una especie de *Chrysosporium* (6,6% en ADN y el 9,8% en ARN), cuyo homólogo más cercano fue *C. pseudomercurarium* (97%).

En la Figura 38b, se observó que los clones representativos de los OTUs mayoritarios de M1 desarrollaron bandas DGGE coincidentes con los perfiles obtenidos para los extractos de ADN y ARN de esta muestra, permitiendo así la identificación de cada una de las bandas.

Muestra M6:

Se detectaron 12 OTUs en el análisis de ADN (porcentaje de clones: 90% Ascomycota, 2,2% Basidiomycota, 7,8% otros eucariotas) y 15 OTUs en el análisis de ARN (porcentaje de clones: 76,6% Ascomycota, 3,7% Basidiomycota, 19,7% otros eucariotas) (Tabla 17).

De nuevo, la mayoría de los hongos pertenecieron a la familia Herpotrichiellaceae (41,8% en ADN y 71,6% en ARN), formando cinco OTUs metabólicamente activos. Los tres mayoritarios correspondieron a las mismas especies descritas en M1. La abundancia de éstas también fue similar, con porcentajes de clones que oscilaron entre 3,3 y 34,1% en ADN, y entre 19,7 al 24,7% en ARN. Además, se detectó la presencia de *Exophiala castellanii* (99%) y otra Herpotrichiellaceae sp. cuyo homólogo más cercano fue *Exophila* sp. (84%), cada una de ellas representadas por un solo clon en el análisis del ARN, clones M6R-57 y M6R-96, respectivamente.

El OTU mayoritario en el análisis del ADN se identificó como *O. lascauxensis* (35,2% de clones), con una homología del 99-100% con las cepas utilizadas para describir esta especie (Capítulo 2). Sin embargo, este hongo no se encontró metabólicamente activo en la mancha en cuestión, pues no se detectó en el análisis del ARN. Plectosphaerellaceae sp. también apareció en M6, aunque su abundancia fue menor que en M1, representando el 9,9% de los clones en ADN y el 2,5% en ARN.

Por otro lado, en esta muestra fue significativa la presencia de otros eucariotas que no eran hongos, constituyendo cinco OTUs diferentes. Dos de ellos, que estaban metabólicamente activos, se agruparon en un mismo OTU al 83% de similitud, representando el 3,3% de los clones en ADN y el 11% de los clones en ARN. Éste grupo fue identificado como *Amoebozoa* sp. y su homólogo más cercano fue *Physarum melleum* (95% identidad, 35% de cobertura); teniendo en cuenta la poca fiabilidad de este resultado BLAST no fue posible aproximar más la identificación.

Muestra M8:

Se detectaron 12 OTUs en el análisis de ADN (porcentaje de clones: 53,6% Ascomycota, 1,2% hongos no identificados, 45,2% otros eucariotas) y 22 OTUs en el análisis de ARN (porcentaje de clones: 22,9% Ascomycota, 1,2% Basidiomycota, 10,4% hongos no identificados, 65,5% otros eucariotas) (Tabla 17).

La mayoría de clones correspondieron a 14 OTUs de eucariotas desconocidos, uno de ellos fue el OTU metabólicamente activo mayoritario, al que pertenecieron el 11% de los clones en ADN y el 42,5% en ARN. Sin embargo, el OTU mayoritario en ADN se identificó como Herpotrichiellaceae sp. (41% de clones en ADN y el 17,2% en ARN), cuyo homólogo más cercano en GenBank fue *Capronia kleinmondensis* (82%). Este OTU también se detectó en la genoteca M1, donde sólo apareció un clon en el análisis del ARN (M1R-3), y en el análisis previo por DGGE (banda 1, Fig. 35). En M8 también se detectó otro Herpotrichiellaceae sp., cuyo

homólogo más cercano en GenBank fue *Capronia coronata* (99% identidad). Este OTU representó el 8,5% de los clones en ADN y el 2,3% en ARN.

No se detectaron en las genotecas de esta muestra los hongos *O. lascauxensis* y *Plectosphaerellaceae* sp., sin embargo, este último sí se aisló en medios de cultivo.

Las particularidades encontradas en la comunidad de la mancha M8 pueden deberse a que está situada en un área de percolación directa de agua. Es probable que en este nicho característico sean abundantes otras comunidades eucariotas, relacionadas con ambientes húmedos, como por ejemplo protozoos, nematodos, etc. Posiblemente el ADN de estos microorganismos amplifique utilizando los cebadores ITS1 e ITS4, y al analizar las secuencias obtenidas no se detecte ninguna homología significativa, debido a que no existen en las bases de datos secuencias ITS de este tipo de microorganismos, ya que mayoritariamente se usa el gen ribosómico 18S para su estudio. Por lo tanto, estos microorganismos desconocidos interfieren en el estudio, enmascarando las comunidades fúngicas. Teniendo en cuenta estas consideraciones cabe pensar que las especies de hongos detectadas tienen realmente una abundancia superior a la estimada; del mismo modo, hongos que no pudieron ser detectados, como por ejemplo *Plectosphaerellaceae* sp., pueden estar presentes, como indicaron los aislamientos en medios de cultivo.

Comunidades fúngicas del aire del Pasaje

Se construyó la genoteca correspondiente al extracto de ADN de la muestra de aire del Pasaje recogida en septiembre de 2010 (A6). Se detectaron 16 OTUs (porcentaje de clones: 76,9% Ascomycota, 23,1% Basidiomycota) (Tabla 18).

El hongo mayoritario se identificó como *Verticillium* sp. (36,9% de clones), cuyo homólogo más cercano en GenBank fue *V. leptobactrum* (98% identidad). Esta especie es un conocido parásito de nemátodos (Godoy y col. 1982, Regaieg y col. 2010), su abundancia puede ser indicativa de la

existencia de estos organismos en la cueva. Bastian y col. (2009a) también detectó esta especie en la cueva de Lascaux, representando menos del 3% de los clones estudiados, y Porca (2011) la aisló frecuentemente del aire de la mayoría de las salas de la cueva, con una abundancia significativa.

El 16,9% de clones se identificaron como una especie de micorriza de la familia Atheliaceae. En el análisis DGGE de esta muestra (Fig. 36) apareció una banda con punto de migración similar a la banda 4 de la muestra A2, identificada como una especie de ectomicorriza con homólogos cercanos en los géneros *Athelia* y *Amphinema*. De hecho, comparando la secuencia de esta banda con la del OTU mencionado, se confirmó que corresponden a la misma especie.

También se detectó de forma abundante el hongo Plectosphaerellaceae sp. (12,3% de clones), frecuentemente asociados a las manchas negras, confirmando que esta especie se dispersa eficientemente por el aire.

El 6,1% de los clones se identificaron como *Fusarium solani*, con una homología del 99% de identidad, responsable del brote fúngico surgido en 2001. Esta especie también se aisló de muestras de manchas lo que indica que sigue presente en la cueva, aún a pesar de los tratamientos biocidas de años anteriores, y sus esporas continúan dispersándose por las corrientes de aire.

El 3,1% de los clones correspondieron a una especie de *Exophiala*, perteneciente al grupo de las “levaduras negras” frecuentemente detectadas en manchas negras mediante DGGE y construcción de genotecas. La secuencia representativa de este OTU coincidió con la banda 1 procedente del perfil DGGE de A6 (Fig. 36).

Algunos de los OTUs de esta genoteca se identificaron como especies de *Aspergillus*, *Malassezia* y *Engyodontium*, que también se detectaron en la genoteca de la muestra C09. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los hongos presentes en el aire han colonizado rápidamente aquellas zonas que se limpiaron y trataron con biocidas.

Tabla 18. Hongos identificados en la muestra de aire del Pasaje (A6) recogida en septiembre de 2010. La genoteca se construyó a partir del análisis del ADN y los OTUs se generaron al 95% de similitud.

OTUs (Clones representativos)	Nº Acceso GenBank	Identificación Taxonómica ^a	Secuencia de GenBank más cercana (% identidad)	Nº clones	%
Muestra A6 - 65 clones analizados (96 clones secuenciados)					
A6-28 ^b	HE664132	Ascomycota, Hypocreales, <i>Verticillium</i>	<i>Verticillium leptobactrum</i> (98)	24	36,9
A6-7	HE664133	Basidiomycota, Atheliaceae	<i>Atheliaceae</i> no cultivable (ectomicorriza) (99)	11	16,9
A6-20	HE664134	Ascomycota, Plectosphaerellaceae	<i>Acremonium nepalense</i> (97)	8	12,3
A6-3	HE664135	Ascomycota (Mitospóricos)	<i>Engyodontium album</i> (95)	8	12,3
A6-6 ^b	HE664136	Ascomycota, Hypocreales, <i>Fusarium</i>	<i>Fusarium solani</i> (99)	4	6,1
A6-22	HE664137	Ascomycota, Herpotrichiellaceae, <i>Exophiala</i>	<i>Exophiala</i> sp. (99)	2	3,1
A6-10	HE664138	Ascomycota, Trichocomaceae, <i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i> (100)	1	1,5
A6-85	HE664139	Ascomycota, Sordariomycetes	<i>Hirsutella</i> sp. (91)	1	1,5
A6-86	HE664140	Ascomycota, Bionectriaceae, <i>Gliomastix</i>	<i>Gliomastix murorum</i> (99)	1	1,5
A6-81	HE664141	Ascomycota, Plectosphaerellaceae, <i>Hypocreales</i>	<i>Acremonium</i> sp. (98)	1	1,5
A6-35	HE664142	Basidiomycota, Malasseziaceae, <i>Malassezia</i>	<i>Malassezia restricta</i> (99)	1	1,5
A6-70	HE664143	Basidiomycota, Entylomataceae, <i>Tilletiopsis</i>	<i>Tilletiopsis pallescens</i> (98)	1	1,5
A6-43	HE664144	Basidiomycota, Meruliaceae, <i>Gloeoporus</i>	<i>Gloeoporus pannocinctus</i> (99)	1	1,5
A6-58	HE664145	Basidiomycota, Corticiaceae, <i>Phebia</i>	<i>Phebia livida</i> (100)	1	1,5

^a: La identificación taxonómica concretó filo, familia y género siempre que fue posible. Sin embargo, en algunos casos sólo fue posible concretar niveles taxonómicos superiores.

^b: Agrupa dos OTUs con idéntica identificación taxonómica, pero con porcentaje de identidad inferior al nivel de corte (95%).

Aislamientos en medios de cultivo

Hongos aislados en muestreos previos, de 2006 a 2009

En los años previos a los estudios desarrollados en esta Tesis Doctoral, del 2006 al 2009, el grupo de investigación del INRA (Dijon, Francia) llevó a cabo diversos muestreos encaminados al aislamiento de hongos asociados a las manchas negras u otras colonizaciones que iban apareciendo en la cueva. Las cepas melanizadas más abundantes en las manchas negras estudiadas fueron las utilizadas en el Capítulo 2 para la descripción de las dos nuevas especies de *Ochroconis* (Tabla 2). Además, se aislaron otras muchas cepas en los distintos muestreos, algunas de las cuales se identificaron por análisis de sus secuencias ITS (Tabla 19).

Se aislaron en repetidas ocasiones los hongos: *Gliomastix murorum*, *Isaria farinosa*, *Mortierella* spp., *Geomyces pannorum* y *Plectosphaerellaceae* sp. Este último, se aisló en julio de 2008 de manchas negras localizadas en la Sala de los Toros, resultando ser la misma especie que se encontró asociada a las manchas negras en los análisis moleculares, con un 100% de identidad nucleotídica.

Hongos y bacterias aislados en 2010

Los primeros aislamientos realizados en este estudio se centraron en los hongos y bacterias más abundantes en las tres manchas con diferente coloración, M2 negra, M3 negra-rosa y M7 verde-amarilla. Los resultados se detallan en la Tabla 20.

Los cultivos mostraron una gran abundancia y diversidad de hongos y bacterias, por ello fue fundamental el análisis de elevadas diluciones (10^{-1} - 10^{-4}) que posibilitaron el aislamiento. A pesar de utilizar un medio selectivo de hongos (DRBC), muchas de las placas fueron rápidamente colonizadas por numerosas bacterias resistentes a los inhibidores bacterianos utilizados (rosa bengala y cloranfenicol).

Tabla 19. Hongos aislados de la cueva de Lascaux en muestreos anteriores a este estudio (2006-2009). Se excluyen los aislamientos de *Ochroconis*.

Fecha muestreo	Cepas aisladas	Localización, muestra	Identificación molecular (% identidad) ^a
19/04/2006	LX 26	Cámara de los Felinos, puntos negros	<i>Gliomastix murorum</i> (99)
19/04/2006	LX 26.2	Cámara de los Felinos, puntos negros	<i>Gliomastix murorum</i> (99)
23/05/2007	LX 1-2	Sala de los Toros	<i>Isaria farinosa</i> (100)
23/05/2007	LX 2-1	Pasaje	<i>Isaria farinosa</i> (100)
23/05/2007	LX 2-2	Pasaje	<i>Penicillium</i> sp. (100)
23/05/2007	LX 3-1	Divertículo Axial	<i>Diaporthe ambigua</i> (100)
23/08/2007	CH 5	Ábside, mancha gris	Clavicipitaceae sp. (100)
23/08/2007	LX CH 22	Sala de los Toros, mancha negra húmeda	<i>Epicoccum nigrum</i> (100)
23/08/2007	LX CH 25	Divertículo Axial, colonia blanca	<i>Isaria farinosa</i> (100)
23/08/2007	LX CH 18	Sala de los Toros, mancha negra	<i>Mortierella alpina</i> (100)
23/08/2007	LX CH 20	Sala de los Toros, mancha negra	<i>Penicillium miczynskii</i> (100)
23/08/2007	LX CH 33	Divertículo Axial, mancha negra	<i>Mortierella</i> sp. (98)
23/08/2007	LX CH 34	Divertículo Axial, colonia blanca	Zygomycete sp. (94)
9/04/2008	LX TR	Pasaje, mancha negra-rosa	<i>Geomyces pannorum</i> (99)
9/07/2008	LX CH41	Sala de los Toros, mancha negra	<i>Acremonium nepalense</i> (97), <i>Plectosphaerella cucumerina</i> (96)
9/07/2008	LX CH42	Sala de los Toros, mancha negra	<i>Acremonium nepalense</i> (97), <i>Plectosphaerella cucumerina</i> (96)
9/07/2008	LX CH44	Sala de los Toros	<i>Acremonium nepalense</i> (97), <i>Plectosphaerella cucumerina</i> (96)
9/07/2008	LX CH60	Nave, mancha amarillenta	<i>Exophiala castellanii</i> (99)
2009	LX PR4-2	Nave	<i>Geomyces pannorum</i> (99)
2009	LX ST	Sala de los Toros	<i>Cladosporium</i> sp. (100)

^a: Identificación basada en el análisis de las regiones ITS del ADNr. Se muestran las especies más cercanas con secuencias depositadas en GenBank.

Tabla 20. Hongos y bacterias más abundantes aislados de tres manchas con distinta coloración, recogidas en febrero del 2010.

Muestras	Cepas aisladas	Nº Acceso GenBank	Identificación molecular (% identidad) ^a
M2 (negra)	LX 101R-1	HE664146	<i>Mortierella alpina</i> (99)
	LX 101R-3	HE664147	<i>Acremonium nepalense</i> (97), <i>Plectosphaerella cucumerina</i> (96)
	LX 101R-6 ^b	HE575200	<i>Ochroconis lascauxensis</i> (100)
	LX 101R-7 ^b	=LX A1	<i>Ochroconis lascauxensis</i> (100)
	B-101R-1	HE664160	<i>Pseudomonas brenneri</i> (100)
	B-101R-2	HE664161	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (100)
	B-101R-3	HE664162	<i>Achromobacter</i> sp., <i>Collimonas</i> sp. (99)
M3 (negra-rosa)	LX 103T-1	HE664148	<i>Mortierella alpina</i> (99)
	LX 103T-3	HE664149	<i>Geomyces pannorum</i> (99)
	LX 103T-4	HE664150	<i>Gliomastix murorum</i> (99)
	LX 103T-5	HE664151	<i>Exophiala castellanii</i> (100)
	B 103T-1	HE664163	<i>Pseudomonas</i> sp. (99) ^d
	B 103T-2	HE664164	<i>Rhodococcus</i> sp. (100) ^d
	B 103T-4	HE664165	<i>Pseudomonas</i> sp. (99) ^d
	B 103T-5 ^c	HE664166	<i>Pseudomonas</i> sp. (100) ^d
M7 (verde – amarilla)	LX 107X-1	HE664152	<i>Penicillium commune</i> (100), <i>P. chrysogenum</i> (100)
	LX 107X-4	HE664153	<i>Volutella citrinella</i> (99), <i>Stilbella</i> sp. (99)
	LX 107X-8 ^b	=LX101R-6	<i>Ochroconis lascauxensis</i> (100)
	B 107X-1	HE664167	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (100)

^a: Identificación basada en el análisis de las secuencias de ADNr: ITS (hongos) y gen 16S (bacterias). Se muestran las especies más cercanas con secuencias depositadas en GenBank.

^b: Cepas identificadas como *O. lascauxensis*, incluidas en los estudios detallados en el Capítulo 2.

^c: Esta cepa bacteriana fue aislada en placas con altas concentraciones de cloruro de benzalconio (12.500 mg/l).

^d: Resultado BLAST donde aparecen varias especies del mismo género con idéntico porcentaje de identidad.

Se detectó *O. lascauxensis* en las tres manchas analizadas, independientemente de su coloración, siendo más abundantes en las manchas de color negro (M2) y negro-rosa (M3), lo que coincidió con las cuantificaciones realizadas por PCR a tiempo real (Fig. 28b). Entre los hongos aislados, fueron especialmente abundantes Plectosphaerellaceae sp. en la mancha negra (Fig. 39a,b), *Exophiala castellanii* (99%) en la mancha negra-rosa (Fig. 39c), y una especie del género *Volutella*, cuyo homólogo más cercano fue *V. citrinella* (99%) en la mancha verde-amarilla (Fig. 39d). Además, se aislaron algunos de los hongos encontrados en anteriores muestreos, *M. alpina* en M2 y M3 (Fig. 39a), y *G. pannorum* y *G. murorum* en M3 (Fig. 39c).

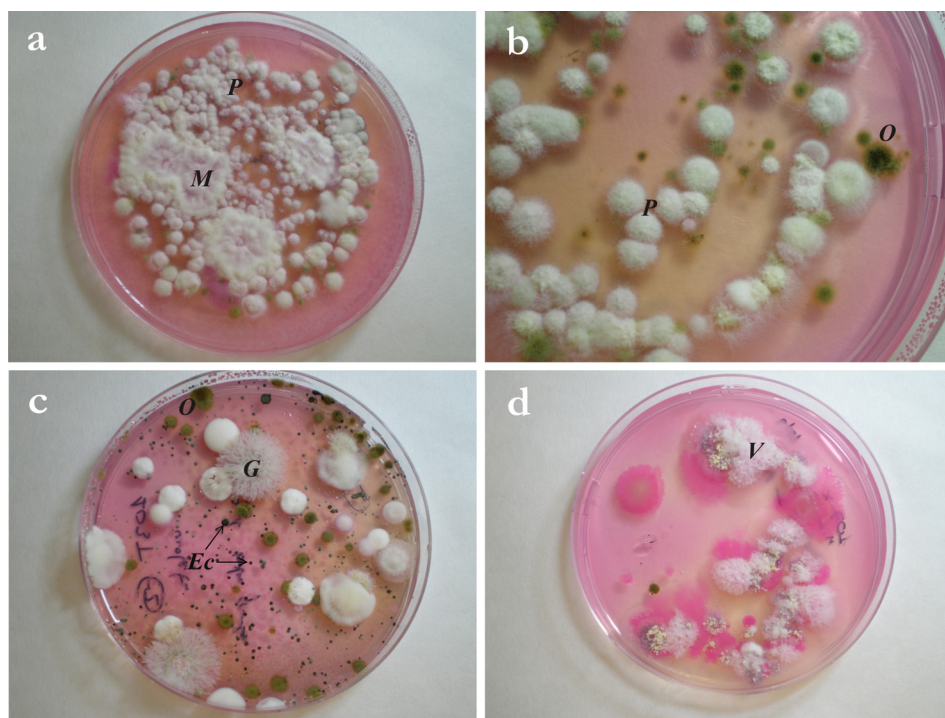


Figura 39. Aislamiento de hongos de manchas recogidas en febrero de 2010, en medio DRBC. **a.** muestra M2 (10^{-1}). **b.** M2 (10^{-2}). **c.** M3 (10^{-2}). **d.** M7 (10^{-1}). Colonias típicas de Plectosphaerellaceae sp. (P), *Mortierella* sp. (M), *O. lascauxensis* (O), *Gliomastix murorum* (G), *Exophiala castellanii* (Ec) y *Volutella* sp. (V).

Las bacterias aisladas pertenecieron a los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter* y *Rhodococcus* (Tabla 20), siendo abundantes las cepas del género *Pseudomonas*, pero en muchos casos no se pudo concretar su identificación a nivel de especie debido a la similitud entre sus secuencias del gen ribosómico 16S. La cepa B-103T-5 se aisló de un medio de cultivo que contenía una elevada cantidad de cloruro de benzalconio (12.500 mg/l) (los detalles de este ensayo no se muestran). Sus homólogos más cercanos, con un 99% de identidad, correspondieron a las especies *P. poae*, *P. fluorescens* y *P. reactans*, entre otras.

Hongos aislados en 2011

Los hongos más relevantes, por su melanización y/o abundancia, aislados de las cinco manchas seleccionadas (M1, M6, M8 y M9, de color negro; y M3 de color negro-rosa), se detallan en la Tabla 21.

Al igual que ocurrió con las muestras recogidas en 2010, la diversidad y abundancia de microorganismos cultivables en estas muestras fue notable (Fig. 40a,b), teniéndose que utilizar para el aislamiento las placas sembradas con las suspensiones más diluidas

Los principales hongos melanizados encontrados pueden clasificarse en tres grupos principales, en función de la morfología de sus colonias, *Ochroconis* spp., “levaduras negras” (*Herpotrichiellaceae* spp.) y *Plectosphaerellaceae* spp. En todas las muestras analizadas se detectaron los tres grupos, exceptuando la muestra M9, donde no se aisló ninguna colonia de “levadura negra”. La abundancia relativa de cada uno de ellos se detalla en la Tabla 21, así como las cepas que se identificaron a nivel molecular, de éstos y otros hongos.

Las colonias de *Ochroconis* spp. fueron especialmente abundantes en las manchas negras M1 (Fig. 40c) y M9. La cepa seleccionada de *Ochroconis* en la muestra M1 (LX M1-3) se identificó como *O. anomala*. Ésta fue una de las dos únicas cepas de esta nueva especie que se encontraron en la cueva de Lascaux (Capítulo 2).

Tabla 21. Hongos aislados de muestras de manchas recogidas en febrero de 2011.

Muestras	<i>Ochroconis</i> ^a	Levaduras negras ^a	Plectosphaerellaceae ^a	Cepas	Nº GenBank	Identificación molecular (% identidad) ^b
M1 (negra)	+++	+	+++	LX M1-1	HE605212	<i>A. nepalense</i> (97%), <i>P. cucumerina</i> (96%)
				LX M1-3	HE575202	<i>O. anomala</i> (100%) ^c
				LX M1-4	HE605213	<i>Exophiala moniliae</i> (96%)
M3 (negra- rosa)	+	+++	+	LX M3-1	HE664154	<i>Mortierella alpina</i> (99%)
				LX M3-2	HE605214	<i>Ochroconis lascauxensis</i> (100%) ^c
				LX M3-(3-8)	HE605215 ^d	<i>Exophiala castellanii</i> (100%)
M6 (negra)	+	++	+++	LX M6-1	HE664155	<i>Doratomyces</i> sp. (99%)
				LX M6-2	HE664156	<i>Isaria farinosa</i> (100%)
				LX M6-3	HE605216	<i>Ochroconis lascauxensis</i> (100%) ^c
				LX M6-(4-9)	HE605217 ^d	<i>Exophiala castellanii</i> (100%)
				LX M6-10	HE605218	<i>A. nepalense</i> (97%), <i>P. cucumerina</i> (96%)
				LX M6-11	HE605219	<i>Chaetothryales</i> sp. (96%), <i>Capronia coronata</i> (90%)
M8 (negra)	+	++	+	LX M8-1	HE605220	<i>A. nepalense</i> (97%), <i>P. cucumerina</i> (96%)
				LX M8-2	HE664157	<i>Acremonium furcatum</i> (99%)
				LX M8-(3y4)	HE664158 ^d	<i>Fusarium solani</i> (100%)
				LX M8-5	HE605221	<i>Ochroconis lascauxensis</i> (100%) ^c
				LX M8-(6-9)	HE605222 ^d	<i>Capronia coronata</i> (99%)
M9 (negra)	++	-	+++	LX M9-1	HE664159	<i>A. nepalense</i> (97%), <i>P. cucumerina</i> (96%)
				LX M9-2	=LX101R-6	<i>Ochroconis lascauxensis</i> (100%) ^c

^a: Detección basada en la morfología de las colonias. Su abundancia se estima como: ausencia (-), presencia leve (+), significativa (++) y abundante (+++).

^b: Identificación basada en el análisis de las secuencias ITS del ADNr. Se muestran las especies más cercanas con secuencias depositadas en GenBank.

^c: Cepas identificadas como *O. lascauxensis* y *O. anomala* según los estudios detallados en el Capítulo 2.

^d: Varias cepas aisladas con idéntica secuencia, sólo se deposita en GenBank una de ellas.

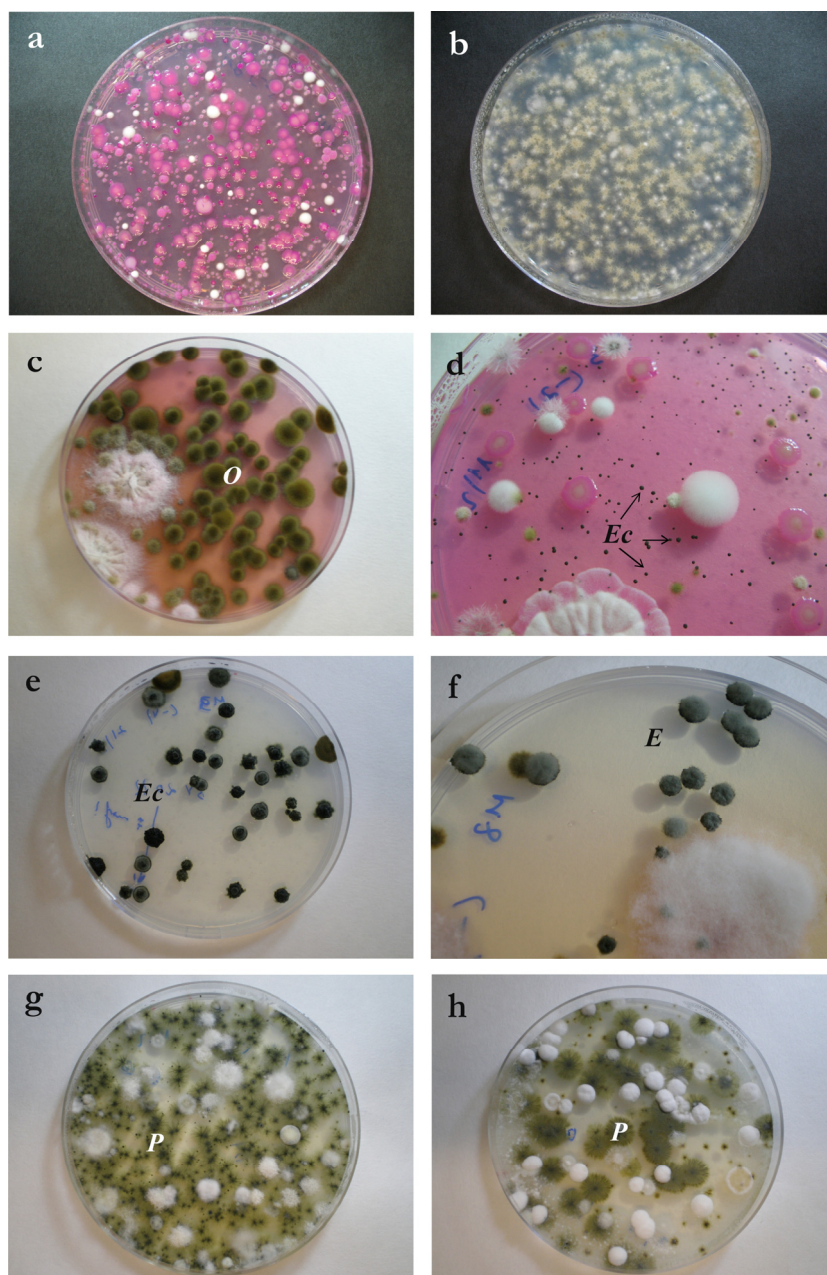


Figura 40. Aislamiento de hongos de las muestras de manchas recogidas en febrero de 2011. **a.** Muestra M6 (10^{-2}) en DRBC. **b.** M9 (10^{-1}) en ECA. **c.** Muestra M1 (10^{-1}) en DRBC. **d.** Muestra M3 (10^{-2}) en DRBC. **e.** Muestra M3 (10^{-4}) en ECA. **f.** Muestra M8 (10^{-4}) en ECA. **g.** Muestra M6 (10^{-2}) en ECA. **h.** Muestra M9 (10^{-2}) en ECA. Colonias típicas de *Ochroconis* sp. (O), *E. castellanii* (Ec), *Exophiala* sp. (E) y *Plectosphaerellaceae* sp. (P).

Respecto a las levaduras negras aisladas, se identificaron cuatro especies de la familia Herpotrichiellaceae. (1) *E. castellanii* (99% identidad), aislándose abundantes colonias en la mancha negra M6 y en especial de la mancha negra-rosa M3 (Fig. 40d,e). (2) *Exophiala* sp., que mostró un 99% de similitud con *Capronia coronata* (anamorfo: *Exophiala* sp.) y con *Exophiala angulospora*, aislándose abundantes colonias de la mancha negra M8 (Fig. 40f). (3) *E. moniliae* (96% identidad), aislándose sólo una colonia de la mancha negra M1 (LX M1-4). (4) Herpotrichiellaceae sp., mostró un 90% de similitud con *Capronia coronata*, y de la que únicamente se aisló la cepa LX M6-11 de la mancha negra M6.

Comparando estos resultados con el análisis de las genotecas (Tabla 17), sólo se detectó un clon de *E. castellanii* en el ARN de la muestra M6 (clon M6-57); este resultado no se pudo comparar con la muestra M3, que no se estudió. La especie de *Exophiala* también se detectó en las genotecas de la muestra M8, representando el 8,5% de los clones en ADN y el 2,3% en ARN. Las dos últimas especies detalladas, *E. moniliae* y Herpotrichiellaceae sp., a pesar de la dificultad de su aislamiento, representaron dos de los OTUs mayoritarios en las manchas negras M1 y M6, ambos metabólicamente activos. Se comprobó que existen diferencias notables entre los resultados moleculares y el aislamiento de las “levaduras negras”.

Otros hongos fundamentales en las manchas estudiadas fueron los identificados molecularmente como Plectosphaerellaceae sp. (*A. nepalense* al 97% y *P. cucumerina* al 96%). Esta especie estuvo presente en todas las muestras, siendo especialmente abundante en las manchas negras M1, M6 y M9 (Tabla 21, Fig. 40g,h). La abundancia de este hongo en M1 y M6 coincidió con sus perfiles DGGE (Fig. 35) y genotecas (Tabla 17). Además, se aislaron una serie de hongos que aparecían de forma recurrente en las muestras de manchas, identificándose molecularmente las siguientes especies: *M. alpina*, *F. solani*. e *I. farinosa*. También se aisló de M8 otra especie del género *Acremonium*, cuyo homólogo más cercano fue *A. furcatum* (98% identidad), que anteriormente se había detectado en la genoteca de esta muestra, OTU representado por un solo clon (M8D-37).

Identificación y caracterización de hongos relevantes

Identificación morfológica

Este apartado está centrado en la identificación de los hongos más relevantes asociados a las manchas negras: Plectosphaerellaceae sp. y las especies de “levaduras negras”. Adicionalmente, se estudio la morfología microscópica de algunas cepas de otros hongos frecuentes en este tipo de muestras, con el objetivo de confirmar la identificación molecular obtenida.

De este modo, se confirmó la identificación de *M. alpina*, *I. farinosa*, *G. murorum*, *G. pannorum*, *F. solani* y *V. citrinella*, aislados en algunos de los muestreos (Fig. 41). Sus características morfológicas coincidieron con las descritas en la bibliografía (de Hoog y col. 2000, Domsch y col. 2007, <http://www.mycobank.org/>). Además, la cepa de *Acremonium* aislada puntualmente de M8 (LX-M8-2, *A. furcatum* 98%) se identificó morfológicamente como *A. persicinum*.

La especie de Plectosphaerellaceae, ampliamente distribuida en las manchas negras, se identificó mediante el estudio de la cepa LX M1-1. Su tasa media de crecimiento a 24°C sobre MEA fue de $61,7 \pm 1,1$ mm/mes. Las colonias crecidas sobre este medio fueron de color blanco con micelio sumergido, que con el paso del tiempo iba oscureciéndose progresivamente en la zona central alcanzando tonos marrones, frecuentemente formando sectores. Las colonias sobre PDA fueron de color crema con los bordes grisáceos, sólo se oscurecían en el reverso manteniendo los colores claros en el anverso (Fig. 42a,b). Presentó abundante esporulación, formando largas fialides simples de 25-55 μm de longitud, a veces algo ramificadas, con un pequeño collarite en la punta donde se producen los conidios. Conidios cilíndricos con extremos redondeados, lisos, $4,5\text{-}5,7 \times 2\text{-}2,5$ μm . Clamidosporas pigmentadas patentes, terminales o intercalares, de 4-5 μm de ancho (Fig. 43a-c). Esta especie se identificó como *A. nepalense*, de acuerdo con la descripción de Gams (1975). Se descartó que pudiera ser la especie *P. cucumerina* (teleomorfo de *Fusarium tabacinum*) con conidios de mayor tamaño y frecuentemente septados.

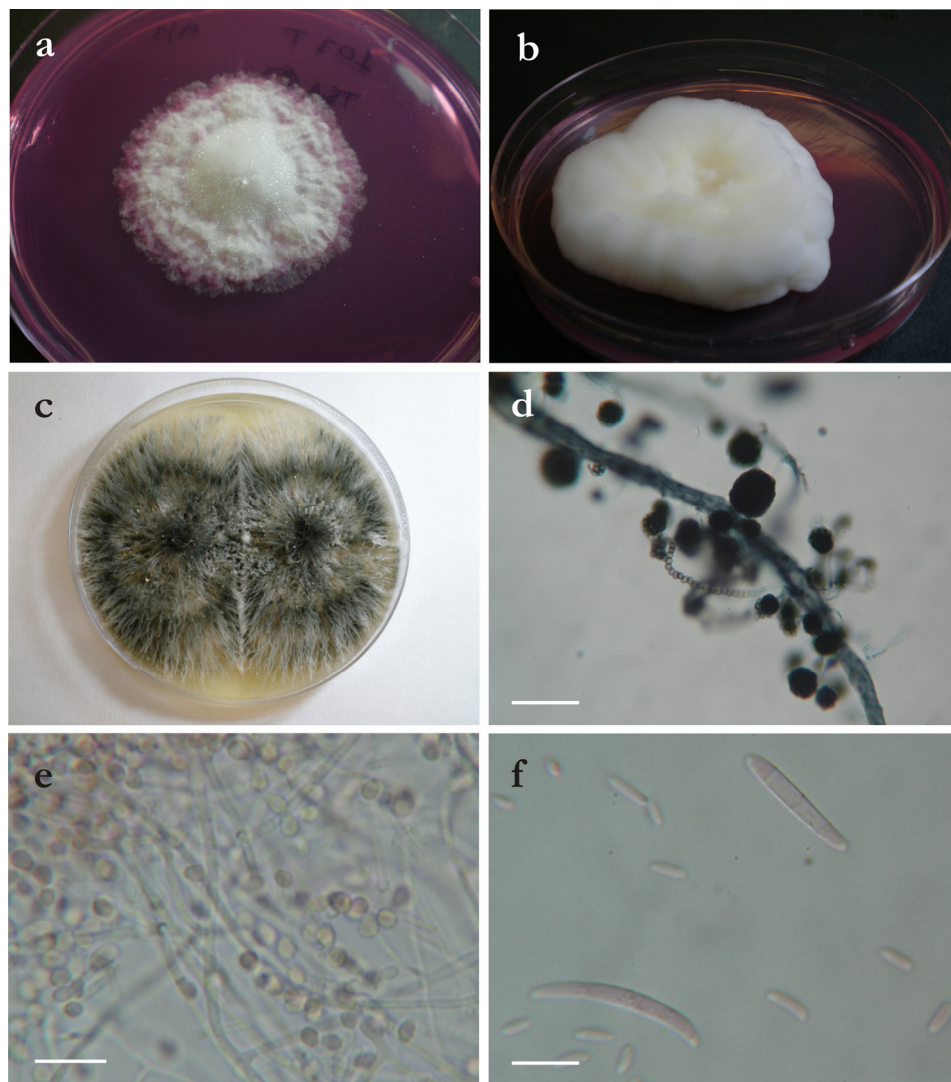


Figura 41. Morfología de algunos hongos frecuentes en las manchas. **a.** Colonia de *M. alpina* LX 101R-1, 10 d en DRBC. **b.** Colonia de *I. farinosa* LX M6-2, un mes en DRBC. **c, d.** *G. murorum* LX 103T-4, colonia crecida un mes en MEA (c), y morfología microscópica (d), barra = 50 µm. **e.** Morfología microscópica de *G. pannorum* LX 103T-3, barra = 10 µm. **f.** Conidios de *F. solani* LX M8-3, barra = 10 µm.

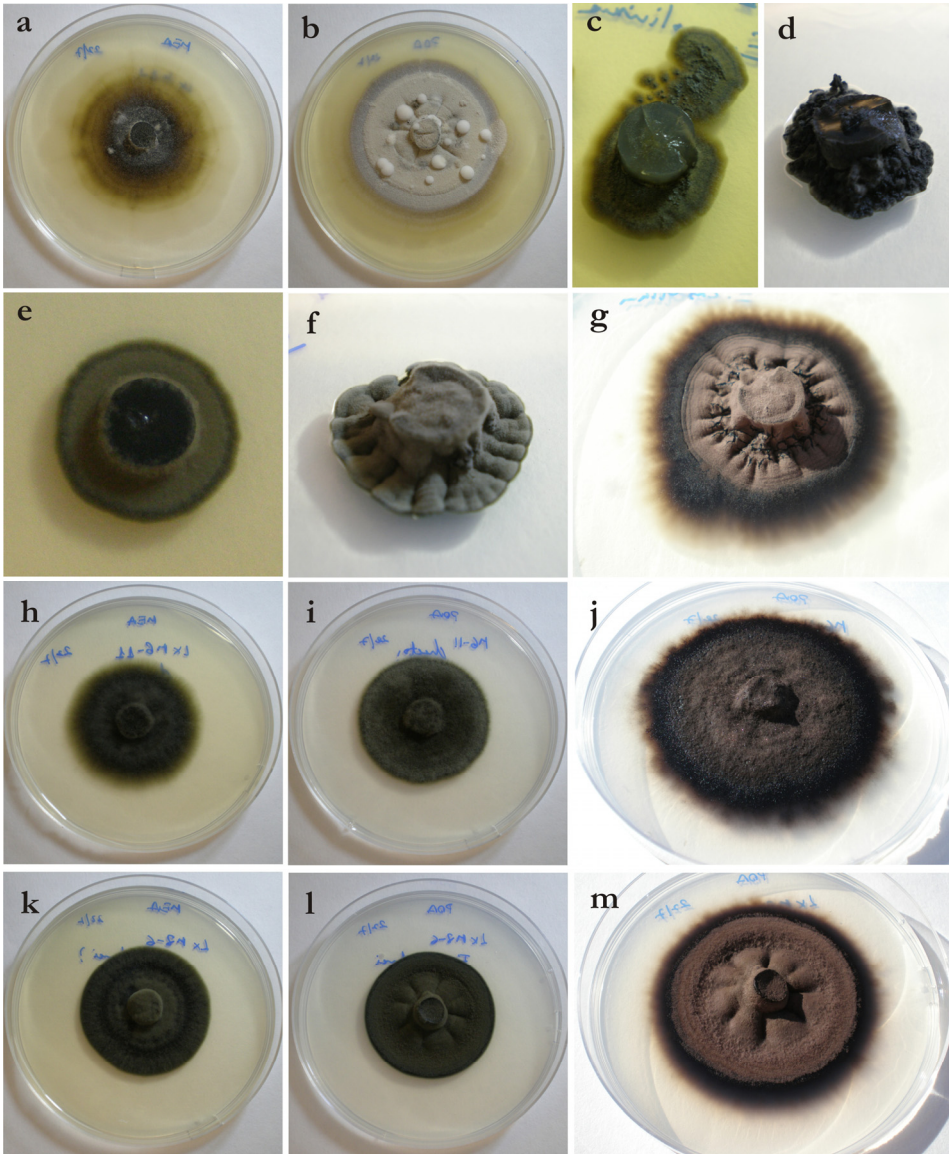


Figura 42. Morfología de las colonias, crecidas en distintos medios de cultivo, de los principales hongos asociados a las manchas negras. **a, b.** *A. nepalense* LX M1-1, 40 d en MEA y PDA, respectivamente. **c, d.** *E. moniliae* LX M1-4, 40 d en MEA y PDA, respectivamente. **e-g.** *E. castellanii* LX M3-3, 40 d en MEA y PDA, y tres meses en PDA, respectivamente. **h-j.** *Herpotrichiellaceae* sp. LX M6-11, 40 d en MEA y PDA, y tres meses en PDA, respectivamente. **k-m.** *Exophiala* sp. LX M8-6, 40 d en MEA y PDA, y tres meses en PDA, respectivamente.

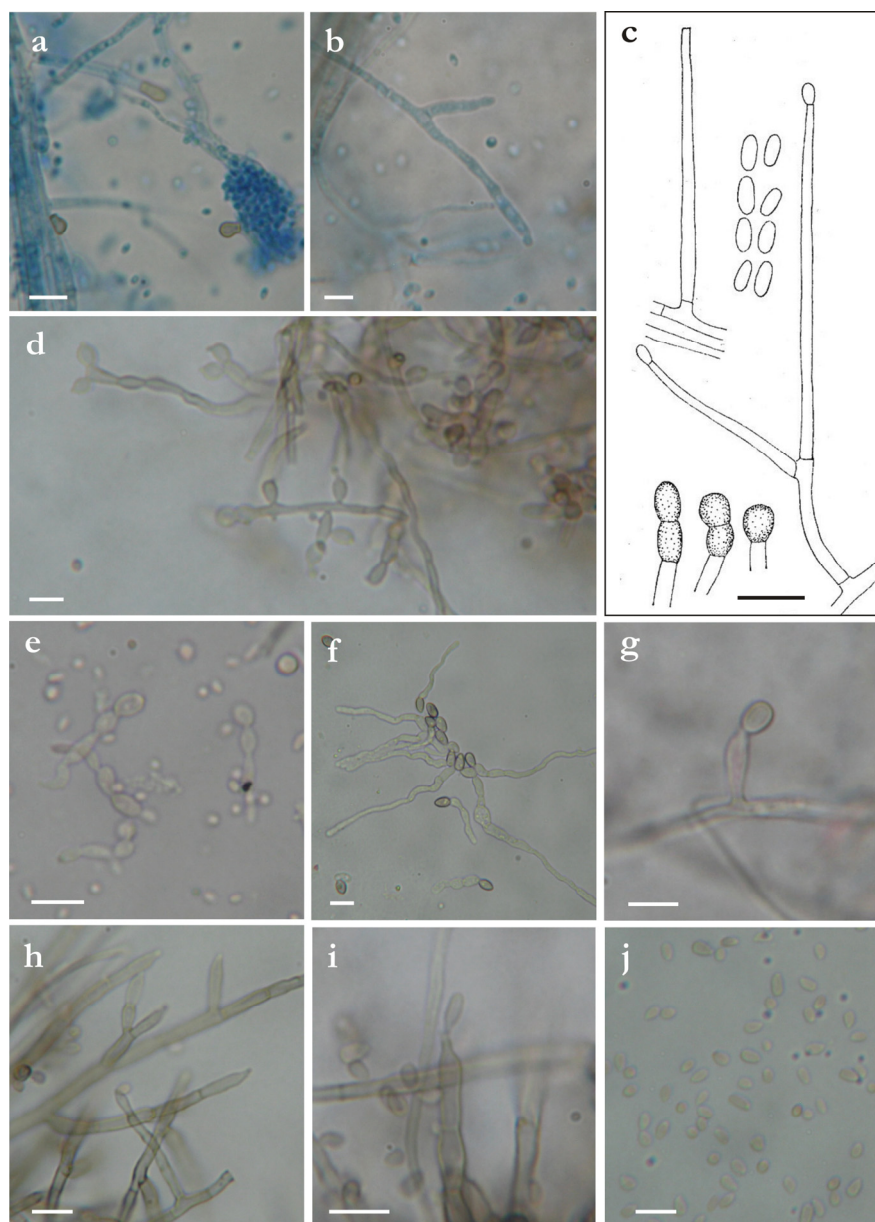


Figura 43. Morfología microscópica de los principales hongos asociados a las manchas negras. **a, b.** *A. nepalense* LX M1-1: conidios y clamidosporas (**a**), y conidióforos (**b**). **c.** Ilustración extraída de la descripción de *A. nepalense* por Gams (1975). **d.** Conidióforos de *E. castellanii* LX M3-3. **e.** Células germinativas de *E. moniliae* LX M1-4. **f, g.** Herpotrichiellaceae sp. LX M6-11, conidios germinados (**f**) y conidióforo (**g**). **h-j.** *Exophiala* sp. LX M8-6, conidióforos (**h, i**) y conidios (**j**). Barras: 10 μm.

Respecto a las cuatro especies aisladas de levaduras negras, se confirmó la identificación de *E. moniliae* con el estudio de la cepa LX M1-4; su morfología coincidió con la descrita para esta especie (de Hoog y Hermanides-Nijhof 1977, de Hoog y col. 2000). Lento crecimiento, con una tasa media a 24°C sobre MEA de $15,2 \pm 0,5$ mm/mes. Las colonias crecidas sobre MEA fueron de color verde oliva oscuro, y sobre PDA de color gris oscuro casi negro con forma verrucosa (Fig. 42c,d). Micelio joven con agrupamientos de células conidiógenas. Micelio maduro donde se distinguían las zonas anilladas. Conidios elipsoidales, lisos, $2,5-4 \times 1,5-2,5$ μm . Células germinativas elipsoidales, de mayor tamaño, $4,4-7,4 \times 3,3-6,7$ μm (Fig. 43e).

También se confirmó la identificación de *E. castellanii* con el estudio de la cepa LX M3-3. Su morfología coincidió con la descrita en la bibliografía (Iwatsu y col. 1984, de Hoog y col. 2000). Su tasa media de crecimiento a 24°C sobre MEA fue de $19,2 \pm 0,5$ mm/mes. Las colonias crecidas sobre MEA fueron planas, de color verde oliva con bordes regulares más oscuros. Las colonias sobre PDA fueron de color gris con forma arrugada, que con el tiempo desarrollaron micelio sumergido de color negro en los bordes (Fig. 42e-g). Abundantes células levaduriformes. Micelio maduro con células conidiógenas intercalares o terminales. Conidios de forma elipsoide y tamaño variable (Fig. 43d).

El estudio morfológico de la cepa LX M6-11 de Herpotrichiellaceae sp., no fue concluyente a nivel de género. Su tasa media de crecimiento a 24°C sobre MEA fue de $25,2 \pm 0,5$ mm/mes. Las colonias crecidas sobre MEA fueron de color gris oliváceo con los bordes algo más oscuros y textura fasciculada. Las colonias sobre PDA fueron de color gris oscuro con textura mullida, que con el tiempo desarrollaron micelio sumergido de color negro en los bordes (Fig. 42h-j). Abundante esporulación. Conidios libres elipsoides u ovoides $8-15 \times 5-7$ μm , a veces septados. Sólo se observan algunos conidióforos sencillos (Fig. 43f,g).

El estudio molecular de *Exophiala* sp. (LX M8-6) mostró un 99% de similitud con *Capronia coronata* (anamorfo: *Exophiala* sp.) y con *E. angulospora*.

Sin embargo, el estudio microscópico demostró que los conidios de esta cepa no presentaban la forma típica de *E. angulospora* (Iwatsu y col. 1991), descartándose que se tratara de esta especie. Su tasa media de crecimiento a 24°C, sobre MEA, fue de $33 \pm 0,7$ mm/mes. Las colonias crecidas sobre MEA fueron de color gris oliváceo con textura mullida. Las colonias sobre PDA fueron de color gris oliváceo con textura velutinosa y pliegues radiales en la zona central, que con el tiempo desarrollaron micelio sumergido de color negro en los bordes (Fig. 42k-m). Conidióforos terminales o intercalares de aproximadamente 15-20 μm de longitud. Conidios mayoritariamente elipsoides, de tamaño variable 5-8 x 2-4 μm . (Fig. 43f,g). Estas características microscópicas fueron semejantes a *Exophiala jeanselmei*, pero no fueron concluyentes para concretar la identificación de la especie.

Relaciones filogenéticas de “levaduras negras”

Las relaciones filogenéticas entre las cepas aisladas de “levaduras negras”, los clones representativos de los OTUs afiliados a la familia Herpotrichiellaceae, y las secuencias de GenBank de sus homólogos más cercanos, se detallan en la Figura 44.

En la filogenia establecida se diferencian ocho especies de “levaduras negras” asociadas a las manchas negras. Todas ellas estuvieron metabólicamente activas de acuerdo con los resultados de las genotecas (Tabla 17).

Las manchas negras M1 y M6 tuvieron una comunidad fúngica similar con tres especies predominantes:

(1) Herpotrichiellaceae sp. 1, cuyos OTUs mostraron un 99-100% de identidad con la única cepa aislada (LX M6-11). Estas secuencias formaron un clado homogéneo, claramente independiente de sus homólogos más cercanos *C. coronata* (91%) y *Cladophialophora chaetospora* (89%), pudiendo ser una especie aún desconocida. Su estudio morfológico no pudo concretar la identificación.

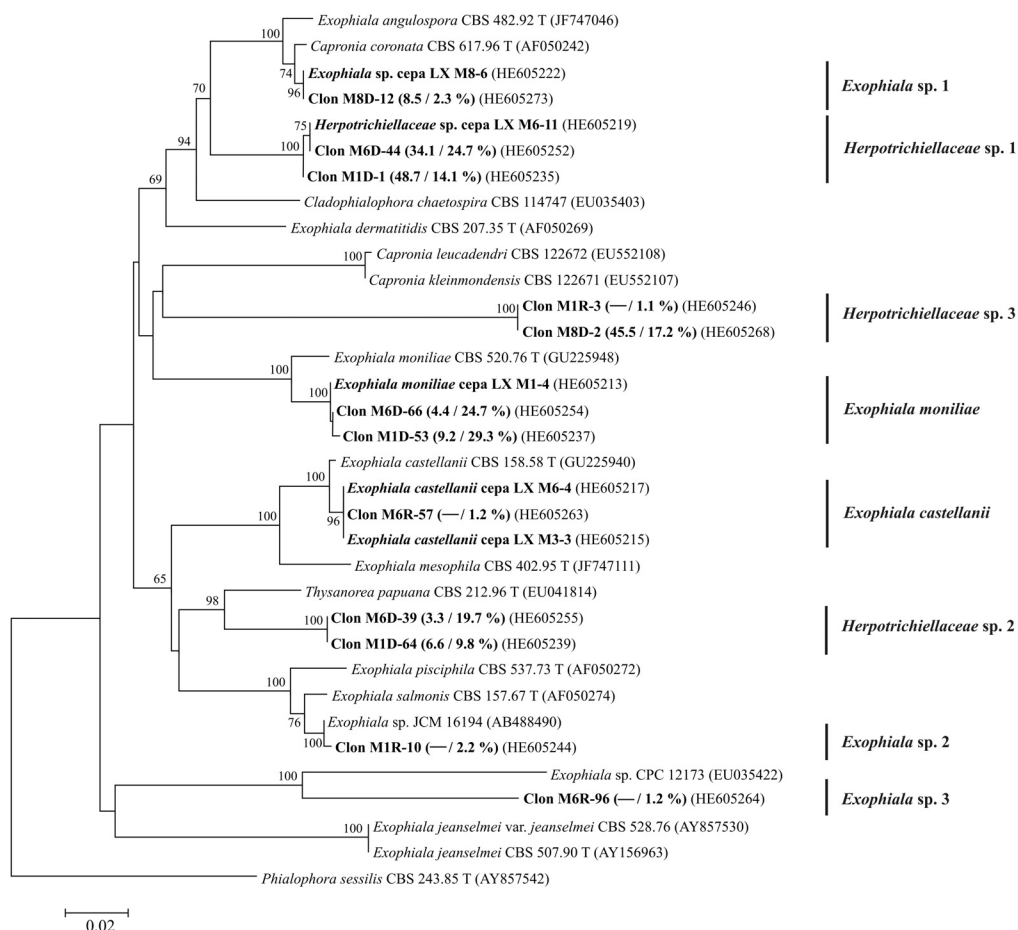


Figura 44. Relaciones filogenéticas entre “levaduras negras” aisladas, clones representativos de los OTUs y las secuencias de GenBank más cercanas, basadas en el análisis de las regiones ITS. Para cada OTU se muestran entre paréntesis los porcentajes de clones identificados en los análisis ADN/ARN. El árbol se obtuvo aplicando el método “Neighbour-Joining”, el modelo de substitución Kimura 2-parámetros, y fue enraizado utilizando *Phialophora sessilis* CBS 243.85^T como grupo externo. Los valores “bootstrap” superiores al 65%, respecto 1.000 réplicas, se muestran en los nudos correspondientes. Estos nudos también se obtuvieron utilizando los algoritmos de Máxima-Probabilidad y Máxima-Parsimonia. La barra representa 0,02 cambios de nucleótidos por posición.

(2) *E. moniliae*, cuyos OTUs tuvieron un 98-100% de identidad con la cepa LX M1-4, único aislamiento conseguido. Estas secuencias se agruparon en un clado homogéneo con la cepa tipo CBS 520.76, confirmando la identificación de la especie.

(3) *Herpotrichiellaceae* sp. 2, compuesta por dos OTUs idénticos que se agruparon en un clado homogéneo claramente independiente de su homólogo más cercano *T. papuana* (91%), pudiendo ser una especie aún desconocida. A pesar de su abundancia en ambas genotecas, no se pudo aislar con los medios de cultivo utilizados.

La muestra M8 presentó dos especies mayoritarias:

(4) *Herpotrichiellaceae* sp. 3, que agrupa los OTUs detectados en M8 y M1 (un solo clon, M1R-3). Ambos, formaron un clado homogéneo claramente independiente de sus homólogos más cercanos *C. kleinmondensis* y *Capronia leucadendri* (82%), pudiendo ser una especie aún desconocida.

(5) *Exophiala* sp. 1, cuyo OTU era idéntico a la cepa LX M8-6. Ambos estuvieron estrechamente relacionados con *C. coronata* y *E. angulospora* (99%), pero no se pudo concretar su identificación, ya que a pesar de la similitud morfológica con *E. jeanselmei*, estas especies estaban muy distantes en el árbol filogenético.

Se encontraron otras tres especies de *Herpotrichiellaceae* con una abundancia mucho menor, de acuerdo con los resultados de las genotecas:

(6) *E. castellanii*, representada por un solo clon en la muestra M6 (M6R-57), con secuencia idéntica a las cepas aisladas de M6 y M3 (LX M3-3 y LX M6-4). Estas secuencias se agruparon en un clado homogéneo con la cepa tipo CBS 158.58, confirmando la identificación de la especie.

(7) *Exophiala* sp. 2, representada por dos clones en la muestra M1 (clon representativo: M1R-10), con una similitud del 99% con la cepa JCM 16194 de *Exophiala*. Estas secuencias se agruparon en un clado homogéneo con las cepas tipo de *Exophiala salmonis* y *Exophiala pisciphila*.

(8) *Exophiala* sp. 3, representada por un solo clon en la muestra M6 (M6R-96), cuyo homólogo más cercano fue la cepa CPC 12173 de *Exophiala* sp. (84%). Esta baja similitud puede deberse a que es una especie aún desconocida.

Tolerancia al cloruro de benzalconio

Se evaluó la tolerancia al BC de las cepas seleccionadas de *A. nepalense* y de las “levaduras negras”. Sus tasas de crecimiento en medio de cultivo con concentraciones crecientes de BC se detallan en la Tabla 22.

Todas las cepas ensayadas fueron sensibles al BC, con un comportamiento similar frente a las distintas concentraciones (Fig. 45). El efecto inhibitorio de este compuesto fue prácticamente inapreciable a bajas concentraciones (100 y 500 mg/l), siendo bastante relevante a partir de 1.000 mg/l. A concentraciones superiores (5.000 y 10.000 mg/l) la inhibición del crecimiento fue prácticamente total en todas cepas, siendo *A. nepalense* LX M1-1 y *Exophiala* sp. LX M8-6 las únicas capaces de crecer a estas concentraciones, aunque de forma mínima.

Tabla 22. Tasas de crecimiento de *A. nepalense* y especies de “levaduras negras” a diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio, expresadas en mm/mes.

Especies	Cepas	MEA+BC (mg/l)					
		MEA (C-)	100	500	1.000	5.000	10.000
<i>A. nepalense</i>	LXM1-1	61,7 ± 1,1	44,7 ± 0,7	n/d	30,7 ± 0,8	n/d	2 ± 0,4
<i>E. moniliae</i>	LXM1-4	15,2 ± 0,5	12,5 ± 0,3	11,2 ± 0,2	10 ± 0,4	-	-
<i>E. castellanii</i>	LXM3-3	19,2 ± 0,5	18 ± 0,4	12,2 ± 0,2	8,2 ± 0,6	-	-
Herpotrich. sp.	LXM6-11	25,2 ± 0,5	24 ± 0,4	18,7 ± 0,5	10 ± 0,4	1,7 ± 0,5	-
<i>Exophiala</i> sp.	LXM8-6	33 ± 0,7	30,7 ± 0,6	25 ± 0,4	19,7 ± 0,5	5 ± 0,4	3 ± 1,2

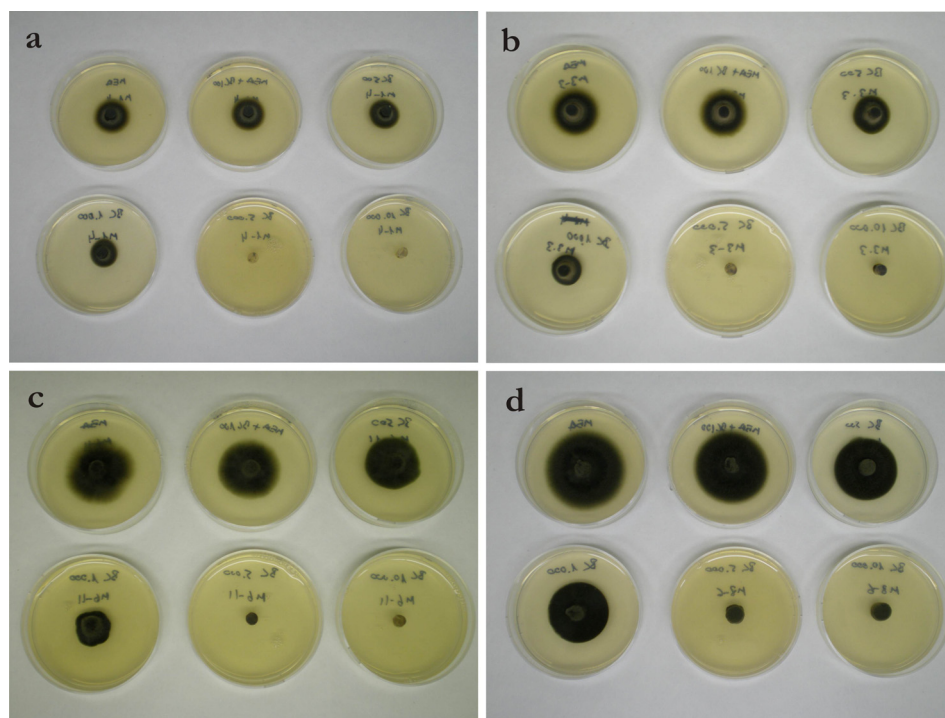


Figura 45. Tolerancia al cloruro de benzalconio de las “levaduras negras” crecidas durante un mes en placas de MEA (6 cm Ø) con cantidades crecientes de BC (0, 100, 500, 1.000, 5.000 y 10.000 mg/l; de izquierda a derecha y de arriba a abajo). **a.** *E. moniliae* cepa LX M1-4. **b.** *E. castellanii* cepa LX M3-3. **c.** *Herpotrichillaceae* sp. cepa LX M6-11. **d.** *Exophiala* sp. cepa LX M8-6.

Capacidad de utilizar compuestos aromáticos como fuentes de carbono

Se evaluó la capacidad de los hongos seleccionados de utilizar los compuestos aromáticos: ácido vanílico (AV), p-toluensulfonato sódico (pTSS) y tolueno. Los resultados de los dos ensayos realizados se detallan en la Tabla 23 y las Figuras 46 y 47.

El AV resultó ser una excelente fuente de carbono para todas las cepas evaluadas, provocando en todos los casos un mayor crecimiento que el control positivo con sacarosa, siendo especialmente llamativo en las especies *O. anomala*, *A. nepalense* y *Exophiala* sp. (Fig. 46).

Tabla 23. Utilización de diversas fuentes de carbono por los principales hongos asociados a las manchas negras de la cueva de Lascaux.

Especies	Cepas	Incremento de crecimiento ^a									Tolueno (atmósfera)
		Control + Sacarosa (%)			Ácido vanílico (%)			p-toluensulfonato sódico (%)			
		0,01	0,05	0,25	0,01	0,05	0,25	0,01	0,05	0,25	
<i>O. lascauxensis</i>	LX A1	1	2	2	2	3	3	0	0	0	2
<i>O. anomala</i>	LX CH40	1	2	2	2	3	2 ^b	0	0	0	2
<i>A. nepalense</i>	LX M1-1	1	2	2	2	3	4	0	0	1	2
<i>E. moniliae</i>	LX M1-4	1	2	2	2	3	2 ^b	1	1	1	1
<i>E. castellanii</i>	LX M3-3	1	2	2	2	3	3	1	1	1	1
Herpotrichiell. sp.	LX M6-11	1	1	1	2	2	1 ^b	0	0	0	2
<i>Exophiala</i> sp.	LX M8-6	1	2	3	2	4	1 ^b	0	0	0	1

^a: Incremento de crecimiento respecto el crecimiento basal presente en el control negativo (sin fuente de carbono). Si no hubo incremento significativo se considera 0, mientras que los incrementos significativos se cuantificaron del 1 al 4 según el tamaño y la densidad de la colonia desarrollada.

^b: La morfología de las colonias desarrolladas a 0,25% de ácido vanílico difiere significativamente de aquellas que se formaron con cantidades menores de este compuesto, mostrando un tamaño menor del esperable.

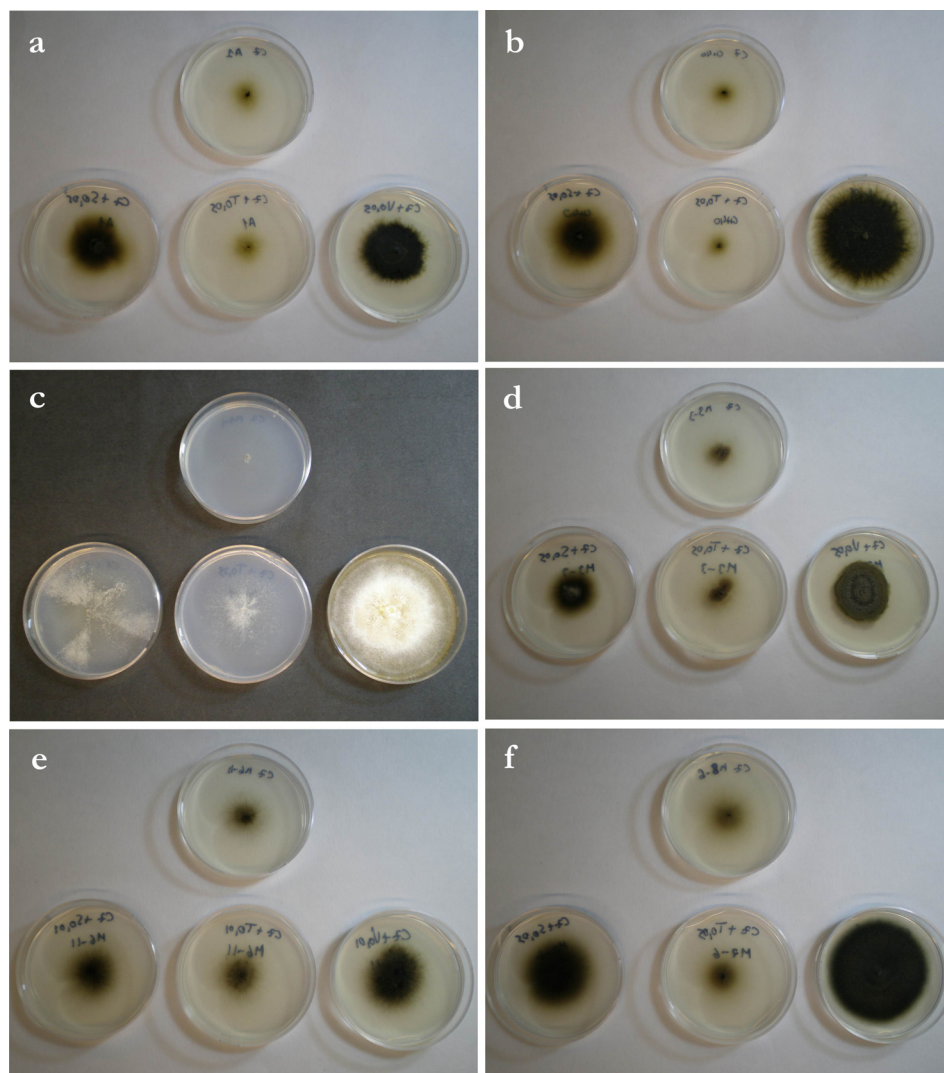


Figura 46. Evaluación de compuestos aromáticos como fuentes de carbono para los hongos seleccionados. **a.** *O. lascauxensis* cepa LX A1. **b.** *O. anomala* LX CH40. **c.** *A. nepalense* LX M1-1. **d.** *E. castellanii* LX M3-3. **e.** *Herpotrichillaceae* sp. LX M6-11. **f.** *Exophiala* sp. LX M8-6. Para cada hongo se muestra la concentración de fuente de carbono a la que se obtuvieron las diferencias más significativas entre los tratamientos. Posición en las fotos: control negativo sin fuente de carbono (arriba), control positivo-sacarosa (abajo-izquierda), p-toluensulfonato sódico (abajo-medio) y ácido vanílico (abajo-derecha).

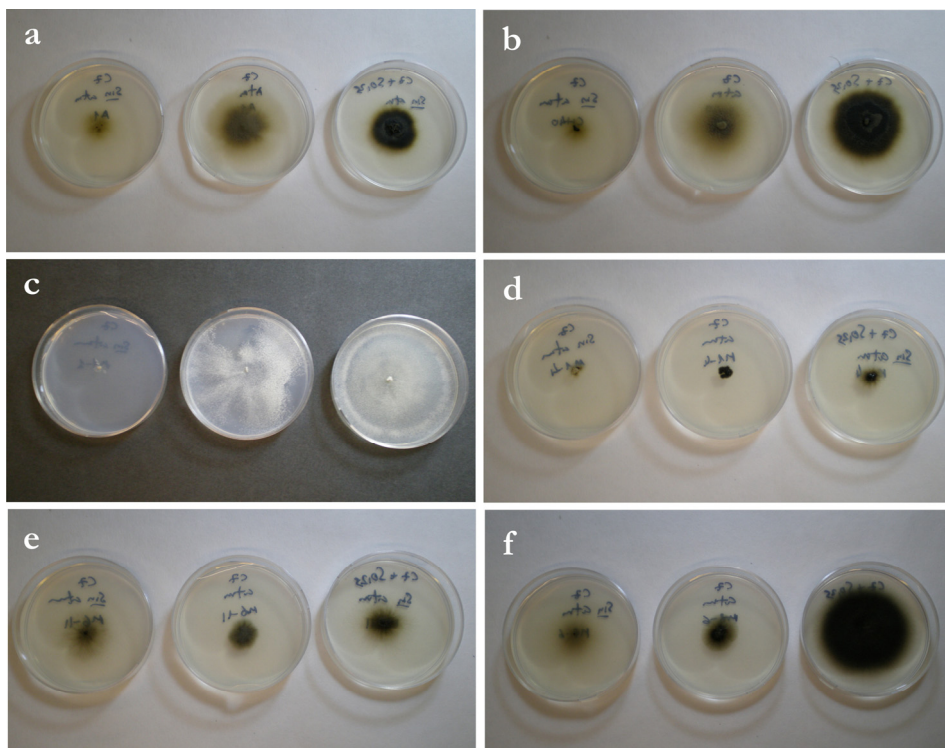


Figura 47. Evaluación del tolueno como fuente de carbono para algunos hongos seleccionados: **a.** *O. lascauxensis* LX A1. **b.** *O. anomala* LX CH40. **c.** *A. nepalense* LX M1-1. **d.** *E. moniliae* LX M1-4. **e.** *Herpotrichillaceae* sp. LX M6-11. **f.** *Exophiala* sp. LX M8-6. **b.** *A. nepalense* LX M1-1. **c.** Posición: control negativo sin fuente de carbono (izquierda), tolueno (medio) y control positivo-sacarosa (derecha).

La concentración intermedia de las fuentes de carbono (0,05%) fue la más adecuada para evaluar estas diferencias. Algunos cultivos con concentraciones superiores de AV (0,25%) desarrollaron colonias de menor tamaño al esperable, poniendo de manifiesto el efecto tóxico del AV a elevadas concentraciones.

El pTSS, por el contrario, no fue utilizado de un modo eficiente por ninguno de los hongos evaluados. Por lo general, produjo un crecimiento similar al desarrollado en el control negativo (crecimiento basal mínimo).

Sólo las especies *E. moniliae*, *E. castellanii* y *A. nepalense* (al 0,25%) mostraron un leve incremento de crecimiento respecto al control negativo.

En cuanto al crecimiento en la atmósfera enriquecida con tolueno, todas las especies evaluadas mostraron un crecimiento significativamente superior al control negativo sin fuente de carbono (Tabla 23), siendo especialmente patente en *O. lascauxensis*, *O. anomala*, y *A. nepalense* (Fig. 47).

Comunidades fúngicas de manchas sobre sedimentos arcillosos

Se analizaron un total de 17 muestras, recogidas entre 2008 y 2010, de manchas que aparecían en las paredes y bancos arcillosos de la cueva. La caracterización inicial de sus comunidades, utilizando la técnica DGGE, ya apuntó claras diferencias en relación con las manchas desarrolladas sobre la roca caliza (Figs. 33-35 y 38a).

En líneas generales, las comunidades fúngicas en este tipo de manchas fueron bastante diversas, siendo frecuentes las especies de “levaduras negras” de la familia Herpotrichiellaceae, y *A. nepalense* en la mayoría de manchas de color negro (claramente en 11 de las 15 muestras analizadas). Ambos taxones se encontraron metabólicamente activos (Fig. 35).

Por el contrario, en ninguna muestra se detectó el patrón característico de la especie *O. lascauxensis*, lo que confirma que esta especie no se encontraba entre los hongos mayoritarios. Sin embargo, las cuantificaciones realizadas por PCR a tiempo real (Fig. 28) y los aislamientos en medios de cultivo (Tablas 20 y 21) indicaron que *O. lascauxensis* estaba presente en todas las muestras analizadas y se aisló fácilmente con las condiciones experimentales descritas. En las genotecas analizadas, correspondientes a tres de las manchas negras recogidas en septiembre de 2010 (M1, M6 y M8), sólo se detectó *O. lascauxensis* en M6, representando un 35,2% de los clones del ADN; sin embargo, esta especie no se encontró metabólicamente activa pues no se detectó en los clones del ARN. La cuantificación por PCR a tiempo real fue coincidente, M6 fue una de las manchas negras con mayor concentración de *O. lascauxensis* (Fig. 28).

Estos resultados pueden deberse a la presencia de una elevada concentración de esporas del hongo, indicativa de una actividad anterior.

Los hongos más abundantes en las genotecas de las tres manchas negras del 2010 fueron especies de “levaduras negras” afiliadas a la familia Herpotrichiellaceae, con porcentajes de clones para el análisis del ADN de 64,5% en M1, 41,8% en M6, y el 50% en M8, y para el del ARN, de 56,5% en M1, 71,6% en M6, y 19,5% en M8 (Tabla 17). Se diferenciaron ocho especies a nivel molecular de acuerdo con la filogenia establecida analizando las secuencias ITS (Fig. 44), cuatro de ellas también se aislaron en medios de cultivo. Las especies *E. castellanii* y *Exophiala* sp. 1 se cultivaron con relativa facilidad, aislandose numerosas colonias a pesar de sus bajos porcentajes en las genotecas. Sin embargo, con las especies *E. moniliae* y Herpotrichiellaceae sp. 1 ocurrió lo contrario, sólo se consiguió aislar una colonia de cada una de ellas, aunque los porcentajes registrados en las genotecas eran significativamente elevados.

En función de la filogenia establecida para las “levaduras negras” (Fig. 44), seis de las ocho especies diferenciadas pudieran ser especies actualmente desconocidas. Dos de ellas correspondieron a las cepas LX M6-11 (Herpotrichiellaceae sp. 1) y LX M8-6 (*Exophiala* sp. 1), en las que habría que realizar estudios morfológicos y moleculares adicionales con el fin de concretar su identificación, y si procede, describirlas como nuevas especies. Las otras cuatro especies, que pueden ser desconocidas, sólo se detectaron a nivel molecular, por ello, no será posible su descripción hasta que no se consiga su aislamiento en medios de cultivos.

En estudios anteriores, realizados por el LRMH, también se aisló una “levadura negra” del género *Phialophora*, de una de las primeras manchas negras aparecida en la Sala de los Toros en noviembre de 2001 (Dosier información contaminación biológica de la cueva, LRMH, Julio de 2002).

Distintos géneros de “levaduras negras” han sido asociados a la formación de manchas negras en monumentos, principalmente los pertenecientes a la familia Herpotrichiellaceae: *Exophiala*, *Phialophora*,

Sarcinomyces y *Coniosporium* (Wollenzien y col. 1995, Gorbushina y col. 2002, Urzì 2004).

Algunas “levaduras negras” son especialmente relevantes por su potencial patogénico: *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Rhinocladiella* y *Veronaea* (Matsumoto y col. 1987, Revankar y Sutton 2010). El género *Exophiala* ha sido implicado en un amplio número y variedad de infecciones humanas; éstas pueden clasificarse en tres categorías principales, feohifomicosis, cromoblastomicosis y micetoma eumicótico, principalmente en pacientes inmunocomprometidos aunque también pueden aparecer en individuos inmunocompetentes. Las especies patógenas de *Exophiala* más relevantes son: *E. jeanselmei*, *E. dermatitidis*, *E. spinifera*, *E. xenobiotica* y *E. oligosperma* (García-Martos y col. 2002, Zeng y col. 2007, Revankar y Sutton 2010). La especie *E. castellanii* ha sido descrita como agente causal de feohifomicosis, tenosinovitis y endocarditis, y *E. moniliae* también se ha asociados a algunos casos de feohifomicosis (García-Martos y col. 2002). Estos dos patógenos se detectaron en la cueva de Lascaux de un modo abundante y metabólicamente activos, *E. moniliae* de acuerdo con las genotecas construidas para las manchas negras M1 y M6 (Tabla 17), y *E. castellanii* en los aislamientos realizados de la mancha negra M6 y de la mancha negra-rosa M3 (Tabla 21). Éstas y otras “levaduras negras” de patogenicidad desconocida pueden representar un importante riesgo para la salud del personal que frecuenta la cueva, por lo que se debería profundizar en el estudio de estos hongos con potencial patogénico y tomarse las medidas de prevención oportunas.

La especie *A. nepalense* se aisló en repetidas ocasiones de las muestras de manchas desarrolladas sobre sustrato arcilloso, estando especialmente asociada a las manchas de color negro (Figs. 39 y 40). En los primeros aislamientos no se le prestó demasiada atención a esta especie debido a que siempre desarrollaba colonias de color blanco en los medios de cultivo utilizados, MEA, PDA y DRBC. Sin embargo, cuando se utilizó el medio ECA, esta especie desarrolló colonias que se oscurecían a los pocos días de cultivo adquiriendo un color gris verdoso característico (Fig. 40g,h). La

abundancia de esta especie en las manchas negras también se demostró con los análisis moleculares, DGGE y genotecas (Figs. 33-35, Tabla 17). Esta especie se detectó metabólicamente activa en las genotecas de M1 y M6, con porcentajes de clones relativamente abundantes, 22,4/23,9% en M1, y 9,9/2,5% en M6, para los análisis ADN/ARN respectivamente (Tabla 17).

Bastian y col. (2009a) identificó un filotipo minoritario (menos del 3% de clones) como *Plectosphaerella cucumerina*, según su secuencia 18S. Considerando los resultados obtenidos en este estudio (Tablas 19-21), probablemente este filotipo realmente correspondía a la especie *A. nepalense*. Recientemente se han detectado distintas especies del género *Acremonium* (sección *Gliomastix*), asociadas a manchas negras que deterioran pinturas murales localizadas en monumentos funerarios de Japón (Kiyuna y col. 2010).

Al analizar la muestra de aire recogida del Pasaje (genoteca A6, Tabla 18) se detectó la especie *A. nepalense* con una abundancia considerable (12,5% de los clones), probablemente se deba a su asociación con manchas negras de los bancos arcillosos de esta galería.

La composición de la comunidad fúngica de la mancha M8 fue un tanto particular, los principales OTUs correspondieron a especies desconocidas de eucariotas, 41,5% de los clones en ADN y 59,6% en ARN. Como ya se ha comentado, los representantes de la familia Herpotrichiellaceae también fueron abundantes, con el 50% de los clones en ADN y el 19,5% en ARN, aunque las especies presentes en esta muestra fueron distintas de aquellas que aparecían en M1 y M6 (Fig. 44). No se encontró *A. nepalense* entre los hongos mayoritarios detectados con las técnicas moleculares, sin embargo, sí se aisló en medios de cultivo.

Este estudio confirma que es necesario el uso combinado de técnicas moleculares y técnicas dependientes de cultivo para realizar una descripción completa de las comunidades fúngicas de las manchas negras. El enfoque más práctico y fiable resultó ser el análisis comparativo del ADN y ARN mediante la construcción de genotecas, lo que permitió identificar las

especies mayoritarias que estaban metabólicamente activas, independientemente de sus limitaciones para ser cultivadas, como en el caso de las “levaduras negras”. Sin embargo, estas técnicas también mostraron algunas limitaciones, ya que en algunas muestras no pudieron detectarse especies relevantes, como *O. lascauxensis* y *A. nepalense*, por su menor abundancia relativa. En estos casos fue imprescindible el uso de técnicas dependientes de cultivo para su detección.

En general, las comunidades fúngicas detectadas en este estudio difieren considerablemente del inventario fúngico elaborado por Bastian y col. (2009a) con muestras recogidas en 2006 y 2007. Únicamente dos de los filotipos mayoritarios establecidos anteriormente, *Isaria farinosa* (8,7% de clones) y *Geomyces pannorum* (4,6% de clones), han sido detectados ocasionalmente en algunos de los análisis de este estudio. Estas diferencias pueden deberse a varios factores. En primer lugar, el presente estudio está centrado en las muestras de manchas, y principalmente en aquellas de color negro, sin embargo, Bastian y col. (2009a) analizaron muestras de origen diverso aunque también incluyeron algunas manchas negras (tres de las 11 muestras analizadas). Además, las identificaciones moleculares del presente estudio estuvieron basadas en el análisis de las regiones ITS en lugar del gen 18S, lo que dificultó la comparación de los resultados. Prueba de ello es que uno de los filotipos minoritario detectado por Bastian y col. (2009a) fue identificado como *Toposporella* sp., cuando realmente correspondía a la especie *O. lascauxensis*, como se demostró en análisis posteriores.

Las comunidades fúngicas de la cueva de Lascaux son difícilmente comparables con las descritas para otras cuevas (Cunningham y col. 1995, Koilraj y col. 1999, Nieves-Rivera 2003, Jurado y col. 2008 y 2009, Docampo y col. 2011, Wang y col. 2010, Vaughan y col. 2011). Esta cueva fue gravemente alterada como consecuencia de las visitas y los medios utilizados para facilitarlas, y su ecosistema se vio sometido a un explosivo aporte de materia orgánica que desencadenó sucesivas crisis microbiológicas y climáticas (Lefèvre 1974, Geneste 2011). Adicionalmente, los tratamientos biocidas aplicados para controlar las invasiones microbianas dieron lugar a

la sustitución de las poblaciones autóctonas por otras ajenas a la propia cueva.

Impacto de los biocidas en la cueva de Lascaux

La cueva de Lascaux ha sido sometida a sucesivos tratamientos biocidas (Tabla 1), intensificados en el periodo de 2001 a 2004 para controlar el brote de *F. solani* y las manchas negras que fueron apareciendo, y reanudados en enero de 2008 para frenar la rápida expansión de las manchas negras. Estos tratamientos estuvieron basados en el uso de un mismo biocida, el BC. Las concentraciones aplicadas de este compuesto fueron de 25.000 mg/l entre 2001-2004 (Vitalub QC50 al 5%), y comprendidas entre 5.000-12.500 mg/l en enero de 2008 (Devor Mousse al 5%). Las primeras manchas negras aparecieron en la cueva de Lascaux en diciembre de 2001, cinco meses después del comienzo de la aplicación masiva de biocidas (Sire 2008).

Bastian y col. (2009a) confirmaron la disminución de la población de *F. solani* tras los tratamientos biocidas, ya que esta especie sólo representó el 1% de los clones obtenidos en el análisis de 11 muestras recogidas de distintas zonas de la cueva en 2006 y 2007. Sin embargo, la consecuencia principal de estos tratamientos fue el aumento de la diversidad fúngica. Se detectaron un elevado número de filotipos en dicho estudio, demostrando que el control de los hongos en la cueva no era cuestión de una única especie (*F. solani*). Esta elevada biodiversidad ha sido confirmada con los resultados expuestos en este trabajo.

Las dos especies descritas de *Ochroconis*, las cuatro especies aisladas de “levaduras negras”, y *A. nepalense* se mostraron claramente sensibles al BC en los ensayos en laboratorio (Figs. 21c,d y 45, Tabla 22). En general, la inhibición de su crecimiento fue muy acusada en medios de cultivos con concentraciones de BC superiores a 1.000 mg/l, cantidad muy inferior a la aplicada en la cueva (entre 5 y 25 veces superior). Estos resultados sugieren que los tratamientos aplicados debieron frenar el desarrollo de estas

especies. Sin embargo, en el ambiente de la cueva hay que tener en cuenta otros factores que pueden desempeñar un papel crucial, como la posibilidad de que bacterias resistentes al BC puedan degradar este biocida, y que la concentración aplicada pueda diferir considerablemente de la que finalmente actúa sobre los microorganismos, debido a la adsorción del biocida sobre el sustrato rocoso (arcillas, calizas, etc.) y a la protección que confieren las biopelículas.

Es bien conocido en la literatura que las bacterias gram negativas son menos susceptibles a estos biocidas que las gram positivas. Especies del género *Pseudomonas* se han adaptado a altas concentraciones de BC (Nagai y col. 1996). En estudios anteriores, Bastian y col. (2009b) aislaron del suelo de la cueva dos especies de *Pseudomonas* (*P. brenneri* y *P. chlororaphis*) capaces de crecer a elevadas concentraciones de Devor Mousse (5 ml/l, equivalente a 500-1.250 mg/l de BC). En este estudio también se aisló, de manchas negras del Pasaje, otra especie de *Pseudomonas* resistente a elevadas concentraciones de BC (12.500 mg/l) (Tabla 20). Tras analizar su gen ribosómico 16S los homólogos más cercanos fueron *P. poae*, *P. fluorescens* y *P. reactans* (100% similitud).

Distintos autores han descrito cepas de *Pseudomonas* capaces de degradar diferentes compuestos de amonio cuaternario (Kroon y col. 1994, van Ginkel y col. 1992, Nishiyama y col. 2000). Las elevadas concentraciones de BC a la que se ha sometido la cueva durante años han favorecido la selección de especies resistentes de *Pseudomonas* (Bastian y col. 2009b), las cuales pueden haber degradado el BC generando productos como la benzildimetilamina (BDAM), benzilmetilamina, benzilamina (BAM), benzaldehído y el ácido benzoico (BA) (Patrauchan y Oriel 2003). Estos productos resultantes pueden ser utilizados por hongos y bacterias como fuentes de carbono y nitrógeno, como apuntan Chelius y Moore (2009) en la cueva del Viento, Dakota, USA. En este estudio, *O. lascauxensis* demostró la capacidad de utilizar como fuente de carbono y/o nitrógeno los productos BDAM, BAM y BA (Figs. 23 y 24).

La estructura química de los biocidas basados en sales de amonio cuaternario, entre los que se encuentra el BC, se caracteriza por la presencia de alquilbencenos. Estos compuestos son muy comunes en suelos y sedimentos, y se encuentran formando parte de las sustancias húmicas, compuestas fundamentalmente por ácidos húmicos y fúlvicos (Martín y col. 1979, Saiz-Jimenez y col. 1986). El carbono orgánico disuelto y los ácidos fúlvicos del suelo también contienen alquilbencenos, y se ha descrito que las sustancias húmicas de aguas y suelos contienen fenoles de lignina y alquilbencenos de hasta 22 átomos de carbono (Saiz-Jimenez 1994b y 1996). Las principales fuentes de fenoles de lignina y alquilbencenos en suelos y sustancias húmicas fueron examinadas por Saiz-Jimenez (1994a,c y 1996). En la cueva de Lascaux, el carbono orgánico disuelto en el agua de percolación, presumiblemente, también estará enriquecido en estos compuestos. Esta agua se filtra a través del suelo del bosque que se encuentra encima de la cueva, situación similar a la descrita en la cueva de Altamira (Saiz-Jimenez y Hermosín 1999).

En el presente estudio se evaluó la capacidad de los principales hongos asociados a las manchas negras, especies de *Ochroconis*, “levaduras negras” y *A. nepalense*, de metabolizar algunos compuestos aromáticos. El ácido vanílico (ácido fenólico derivado de la degradación de la lignina) y el tolueno (alquilbenceno) se utilizaron como fuente de carbono por todas las cepas evaluadas (Tabla 23, Figs. 46 y 47). Especialmente el ácido vanílico se metabolizó con gran eficiencia, ocasionando tasas de crecimiento superiores a las producidas en presencia de sacarosa.

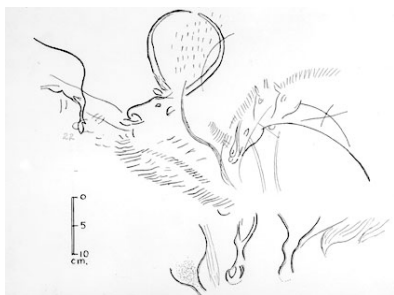
Especies de la familia Herpotrichiellaceae, y en especial del género *Exophiala*, aparecen frecuentemente asociadas a ambientes ricos en compuestos aromáticos, siendo capaces de asimilar los alquilbencenos como única fuente de carbono (Cox y col. 1993, Prenafeta-Boldú y col. 2001 y 2006, Zhao y col. 2010, Seyedmousavi y col. 2011). En este sentido, la familia Herpotrichiellaceae está considerada como el principal taxón capaz de metabolizar alquilbencenos, debido al número de aislamientos encontrados y a la diversidad de hábitats donde aparecen (Prenafeta-Boldú y

col. 2006). Algunas cepas de *Exophiala* asimilaron 54 de 63 compuestos aromáticos ensayados, incluyendo un número elevado fenoles de lignina (Middelhoven 1993).

Diferentes cepas del género *Scolecobasidium* (= *Ochroconis*) y de la familia Herpotrichiellaceae, aisladas de baños o lavadoras, fueron capaces de utilizar los detergentes como fuente nutritiva (Hamada y Abe 2009a,b). La adición a los medios de cultivo del detergente dodecylbencenosulfonato sódico estimuló el crecimiento de estos hongos (Hamada y Abe 2009a). Los alquilbencenosulfonatos y los alquilbencenos son componentes ubicuos de los detergentes de lavandería y los surfactantes comerciales (Saiz-Jimenez 1994a). En este estudio se evaluó como fuente de carbono la molécula p-toluensulfonato sódico (derivada de detergentes), y ninguna de las cepas seleccionadas demostró claramente su capacidad de utilizar este compuesto (Tabla 23, Fig. 46).

Teniendo en cuenta las características discutidas de la familia Herpotrichiellaceae y del género *Ochroconis*, y la capacidad de los hongos evaluados de metabolizar distintos tipos de compuestos, probablemente el origen y la abundancia de estas especies en la cueva de Lascaux esté relacionado con los tratamientos biocidas anteriores y con la introducción de carbono orgánico disuelto (por ejemplo, fenoles de lignina) en el agua de percolación, especialmente durante los períodos de fuertes lluvias.

Se han realizado investigaciones significativas sobre los efectos del BC en procariontas (McBain y col. 2004), sin embargo, en eucariotas se conoce muy poco al respecto (Zabielska-Matejuk y Czaczyk 2006). El uso continuado de un único compuesto biocida (BC) en un ambiente subterráneo fue un gran error que marcó el destino de las comunidades microbianas de la cueva de Lascaux. Para evitar la resistencia microbiana debió incluirse en los protocolos de control un segundo biocida o realizar la rotación de diferentes biocidas (Langsrud y Sundheim 1997, Langsrud y col. 2003, Hegstad y col. 2010, Cortesia y col. 2010). Por desgracia estas consideraciones no se tuvieron en cuenta.



CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN DE LAS MANCHAS NEGRAS DE LA CUEVA DE LASCAUX

El objetivo principal de este capítulo fue la caracterización de las manchas negras de la cueva de Lascaux aplicando diversas técnicas, como la microscopía electrónica de barrido y transmisión, que permitieron conocer la composición de las manchas y los microorganismos que la habitan.

Se caracterizó la naturaleza bioquímica de las manchas y de otras muestras (cepas, melanina fúngica, etc.), por espectroscopía Raman intensificada por superficies (SERS) y análisis de los ácidos grasos, tratando de dilucidar el papel que juega la melanina de *Ochroconis* en el color negro de las manchas, y la importancia de los colémbolos en su dispersión.

Además, se estudió la presencia de óxidos de manganeso en las manchas negras, y la capacidad de los hongos aislados de la cueva de inducir la precipitación de estos óxidos.

Material y métodos

Muestras analizadas

Las muestras de manchas negras cuyos análisis se incluyen en este capítulo aparecen detalladas en la Tabla 24, todas ellas proceden de bancos laterales o paredes con sustrato arcilloso.

Tabla 24. Muestras de manchas negras utilizadas en el capítulo 5.

Muestra	Fecha	Localización	Análisis realizados
D4	Febrero 2007	Ábside, derecha, arcilla	Microscopía TEM
2	09/07/2008	Sala de los Toros, izquierda, arcilla	SERS
3	09/07/2008	Divertículo Axial, derecha, arcilla	SERS
6	09/07/2008	Ábside superior, izquierda, arcilla (Igual que M5, abundantes colémbolos)	Ácidos grasos
7	09/07/2008	Ábside superior, derecha, arcilla (formando anillos, similar a M6 y M9)	Ácidos grasos
M-LX10	20/10/2009	Divertículo Axial, al fondo, sobre arcilla (mancha con abundantes colémbolos)	SERS
M-LX16	20/10/2009	Nave, derecha, sobre arcilla	SERS
M2	17/02/2010 29/09/2010	Pasaje, derecha, sobre arcilla	Ácidos grasos Microscopía FESEM-EDS

Antes del desarrollo de esta Tesis Doctoral, se analizó por microscopía electrónica de transmisión una mancha negra recogida en febrero de 2007 (D4), localizada en la base de la pared derecha del Ábside (Fig. 48a). Estos datos han sido incluidos para complementar los análisis posteriores. En septiembre de 2010, se recogió otra muestra con características similares para el análisis por microscopía electrónica de barrido. Ésta corresponde a la mancha M2 (Fig. 48b), de la que ya se han obtenido diversos resultados: caracterización de comunidades fúngicas por DGGE y aislamiento en medio de cultivo.

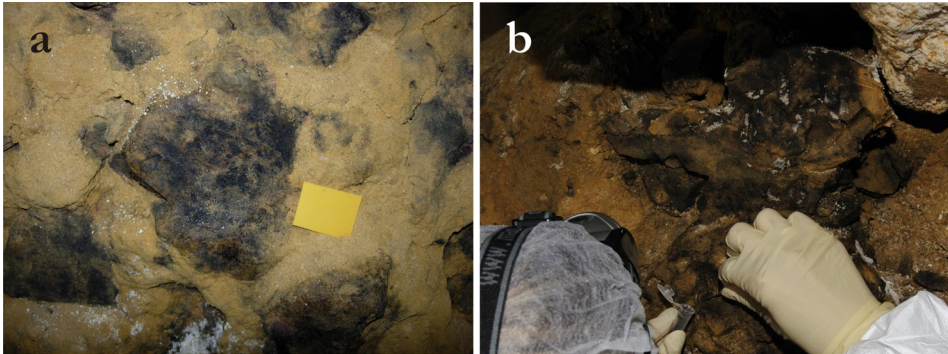


Figura 48. Muestras de manchas negras utilizadas en los análisis microscópicos. **a.** D4, localizada en el sustrato arcilloso de la base de la pared derecha del Ábside. **b.** M2, localizada en el banco arcilloso del lateral derecho del Pasaje.

Los análisis SERS se realizaron con cuatro muestras de manchas negras, recogidas en julio de 2008 (2 y 3) y en octubre de 2009 (M-LX10 y M-LX 16) (Tabla 28). También se analizó la melanina de las cepas LX A1 y LX CH16 de *O. lascauxensis* y de la cepa de referencia CBS 100438 de *O. tshanytschae*, con el fin de comprobar si la melanina de estos hongos contribuye a la formación de las manchas negras. Se incluyeron, como análisis comparativos, la melanina de los hongos *Aspergillus niger* y *Stachybotrys chartarum*, anteriormente investigados por Saiz-Jimenez (1995). Adicionalmente, se analizó una muestra de excrementos de colémbolos de la especie *Folsomia candida*, alimentados con micelios de *O. lascauxensis*.

Se analizó el perfil de los ácidos grasos de tres manchas negras, recogidas en julio de 2008 (6 y 7) y en febrero de 2010 (M2) (Tabla 28). Estos resultados se compararon con los perfiles de ácidos grasos de distintas cepas microbianas aisladas de la cueva, nueve hongos: *O. lascauxensis*, *A. nepalense*, *G. pannorum*, *E. castellanii*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *I. farinosa*, *V. citrinella* y *G. murorum*, y nueve bacterias de los géneros: *Agrobacterium*, *Ochrobactrum*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Achromobacter* y *Pseudomonas*. Además se analizaron los ácidos grasos presentes en los extractos de melanina de *O. lascauxensis* (LX A1 y LX

CH16) y *O. tshanrytschae* (CBS 100438), y la muestra de excrementos de *F. candida*.

Estudio microscópico de las manchas negras

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Estos análisis se realizaron en el Departamento de Productos Naturales, Biología Vegetal y Edafología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, por la Profesora Mariona Hernández Maríné.

Las muestras se fijaron inicialmente en una solución de glutaraldehído (2,5%) en tampón de cacodilato (0,1 M). A continuación, se pasaron a una solución de tetróxido de osmio (1%) en el mismo tampón. La deshidratación se realizó con concentraciones ascendentes de acetona. Posteriormente, las muestras se incluyeron en resina Spurr para realizar los cortes ultra finos (70 nm) con el ultra micrótopo. Éstos se colocaron en rejillas de cobre cubiertas con una membrana de formvar y contrastados con soluciones de sales de metales pesados (acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo). Las observaciones se realizaron con un microscopio electrónico de transmisión (TEM) Jeol 1010.

Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)

Estas técnicas se han utilizado para caracterizar la morfología y composición química de las manchas negras, y detectar los microorganismos asociados a ellas, y fueron realizadas por la Dra. Ana Zelia Miller, del Instituto Superior Técnico de Lisboa, Portugal.

Para el análisis SEM no fue necesaria una fijación previa de las muestras. Directamente se recubrieron mediante pulverización catódica (“sputtering”) con una capa fina de oro y paladio, y se observaron con un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-7001F con filamento/columna de emisión de campo (FESEM), en modo de electrones secundarios, y

equipado con un detector de energía dispersiva de rayos X (Oxford Instruments). La energía del haz de electrones utilizada fue de 15 kV y se tomaron imágenes a diferentes aumentos.

Los microanálisis de EDS proporcionaron información cualitativa y semicuantitativa de la composición química de las muestras, representada con espectros e imágenes de distribución de los elementos químicos presentes en la muestra. Estos espectros se obtuvieron mediante el software INCA. Para el análisis semicuantitativo se ha utilizado el método de corrección ZAF que tiene en cuenta el aporte del número atómico (Z), la absorción (A) y la fluorescencia (F).

Naturaleza bioquímica de las manchas negras

Extracción de melaninas de bongos

Las cepas de *O. lascauxensis* (LX A1 y LX CH16) y *O. tschamyschae* (CBS 100438) se cultivaron en medio líquido ME en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Cada matraz se inoculó con 2 ml de una suspensión micelial elaborada como se describe en el capítulo 2. Los matraces se incubaron a 22°C en agitación (150 rpm) durante un mes (Fig. 49a). La biomasa resultante se filtró por doble gasa y se homogenizó en agua destilada utilizando una batidora (Krupps) (5 minutos a velocidad máxima) (Fig. 49b,c).

Para la extracción, se añadió NaOH (5 N) hasta alcanzar la concentración 0,5 N en la mezcla (Fig. 49d). Se agitó por volteo durante 24 horas, se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos, y se recuperó por filtración el sobrenadante que contenía la melanina (Fig. 49e).

El precipitado se resuspendió de nuevo en NaOH 0,5 N. Este proceso de extracción se repitió 7 veces, los sobrenadantes obtenidos se acidificaron con HCl 12 N hasta pH 2 y permanecieron en reposo hasta la total precipitación de la melanina. Se recuperó el precipitado y se lavó dos veces con agua destilada (Fig. 49f,g). Posteriormente, para eliminar los iones cloruro de las muestras, se llevó a cabo la diálisis con sucesivos cambios de

agua destilada durante 5 días (Fig. 49h), hasta conseguir una reacción negativa de los iones Cl^- con una solución de NO_3Ag . Por último, la melanina resultante se secó a 30°C de temperatura y se conservó a temperatura ambiente hasta su análisis (Fig. 49i).

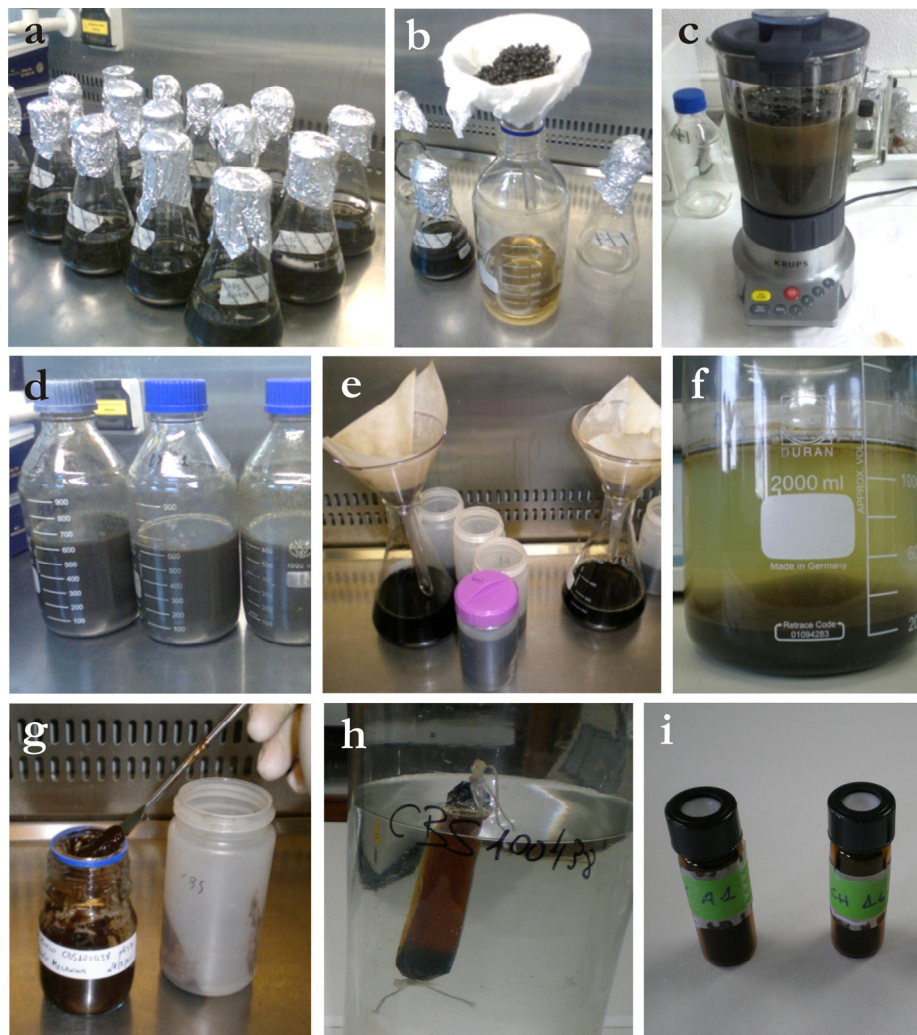


Figura 49. Extracción de la melanina de hongos. **a.** Cultivos en medio ME. **b.** Filtración de la biomasa resultante. **c.** Homogenización en agua destilada estéril. **d.** Extracción con NaOH . **e.** Separación del sobrenadante que contiene la melanina. **f.** Precipitación de melanina con HCl . **g.** Recuperación de la melanina. **h.** Diálisis. **i.** Producto final de la extracción.

Mantenimiento de colémbolos alimentados con O. lascauxensis

En estudios anteriores, Bastian y col. (2010) demostraron que los colémbolos de la especie *Folsomia candida* se alimentaban del micelio de los hongos *F. solani* y *Scolecobasidium* sp., aislados de la cueva de Lascaux.

Para los posteriores análisis químicos, individuos de *F. candida*, procedentes de la cueva Gombasecka (Eslovaquia), se introdujeron en placas Petri con yeso, añadiéndoles como alimento micelio de la cepa LX CH16 de *O. lascauxensis*. Dos meses después, los colémbolos habían consumido prácticamente todo el micelio, dispersando sus excrementos por toda la placa. Se recogieron muestras de éstos para el análisis de espectroscopía SERS y de los ácidos grasos.

Análisis SERS

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico permitiendo así su identificación. Esta técnica se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada experimentando ligeros cambios de frecuencia, característicos de la naturaleza del material analizado. Se trata de una técnica de análisis no-destruktiva que se aplica directamente sobre el material, sin necesidad de ningún tipo de preparación especial.

En este estudio se empleó la espectroscopía Raman intensificada por superficies (“Surface Enhanced Raman Spectroscopy”, SERS). Esta técnica emplea superficies metálicas nanoestructuradas para atenuar la elevada fluorescencia de determinadas sustancias, como los pigmentos, transfiriendo la energía a las nanopartículas del metal y permitiendo el análisis de sus espectros Raman. Otra ventaja de la espectroscopía SERS es su elevada sensibilidad, que permite la detección de los pigmentos a muy bajas concentraciones, pudiendo detectar moléculas individuales y macromoléculas.

El objetivo de estos análisis fue caracterizar las melaninas o las macromoléculas de los cromóforos que contribuyen al color de las manchas negras. En general, las melaninas de hongos son una mezcla compleja de polisacáridos, proteínas, lípidos y compuestos aromáticos, y algunas de sus características estructurales pueden reconocerse fácilmente usando diferentes herramientas de análisis, entre ellas la espectroscopía SERS.

Estos análisis se realizaron por el grupo de investigación del Dr. Santiago Sánchez Cortés del Instituto de Estructura de la Materia (IEM-CSIC), Madrid.

Como coloide metálico se emplearon nanopartículas de plata, preparadas por reducción con hidroxilamina, como describieron Cañameres y col. (2005). Un total de 300 μl de una solución de hidróxido sódico (1 M) se añadieron a 90 ml de una solución de clorhidrato de hidroxilamina (0,06 M), a continuación, se añadieron 10 ml de una solución de nitrato de plata (0,001 M) gota a gota a la mezcla anterior en agitación. Un miligramo de la muestra a analizar se disolvió en 1 ml de NaOH (1 N), dejando reposar la mezcla durante 24 horas para favorecer la extracción. A continuación, 5 μl de la muestra extraída se añadieron a 485 μl de la suspensión de nanopartículas de plata, y se indujo la agregación añadiendo 10 μl de KNO_3 (0,5 M). Se trasvasó la mezcla a una cubeta de cuarzo para realizar las medidas en el rango de 4.000 a 100 ondas/ cm^{-1} . Los espectros Raman se registraron con un equipo Renishaw Raman RM2000, equipado con una cámara de carga acoplada (CCD) que transforma los fotones de la luz dispersada en señal eléctrica digital con la que se elabora el espectro. Se utilizó una línea de excitación a 514 nm de longitud de onda, proporcionada por un láser de Ar^+ . Los espectros resultantes son la media de 10 exploraciones de 5 segundos, utilizando una potencia de láser en la muestra de 2 mW.

Análisis de ácidos grasos

Estos análisis se realizaron en colaboración con la Dra. Valme Jurado Lobo, del IRNAS-CSIC, Sevilla.

Se utilizó la técnica de cromatografía de gases con un equipo HP-6890 (Hewlett-Packard), siguiendo las instrucciones del fabricante del sistema de identificación MIDI y el protocolo de extracción descrito por Miller y Berger (1985), como se especificó para la caracterización de las cepas de *Ochroconis* (capítulo 2).

La metodología desarrollada para las cepas fúngicas fue idéntica a la mencionada. Las cepas bacterianas se cultivaron en medio TSA, a 28°C durante 24 horas, utilizando unos 20-40 mg de la biomasa para la extracción de los ácidos grasos. Se utilizaron unos 80 mg de las muestras de manchas y 20 mg de excrementos de colémbolos en los análisis. Sin embargo, para analizar los extractos de melanina, se procesó una cantidad mucho menor, de aproximadamente 1-2 mg. Cada muestra se analizó por triplicado.

Además, se analizaron diferentes mezclas de los extractos de las cepas microbianas: mezcla de nueve hongos, mezcla de nueve bacterias y mezcla de hongos y bacterias. Para comparar los perfiles de ácidos grasos obtenidos, se llevó a cabo un análisis de componentes principales utilizando el programa informático Sherlock MIDI versión 4.5.

Ensayo de inhibición de la biosíntesis de melanina

El objetivo de este ensayo fue caracterizar el tipo de melanina que producen algunos hongos aislados de la cueva de Lascaux. Se analizaron seis especies de hongos melanizados: *O. lascauxensis* (LX A1 y LX CH16), *Epicoccum nigrum* (LX CH22), *E. castellanii* (LX 103T-5), *Cladosporium* sp. (LX 53Y-1), *A. nepalense* (LX 101R-3) y *G. murorum* (LX 103T-4). También se incluyeron en estos análisis las cinco cepas de referencia de los géneros *Ochroconis* y *Scolecobasidium*, procedentes de la colección del CBS.

Las cepas seleccionadas se cultivaron por duplicado en placas de medio MEA adicionadas con compuestos inhibidores de la síntesis de melanina (30 mg/l). Se ensayaron dos compuestos, el triciclazol que inhibe la síntesis de la melanina procedente del precursor 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN), y el ácido kójico que inhibe la formación de la melanina procedente del precursor 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) (Suryanarayanan y col. 2004). Se incluyeron cultivos en medio MEA sin aditivos como control. Todas las placas se incubaron a 22°C durante 36 días. Tras este periodo, se evaluó el aspecto de las colonias desarrolladas, registrando cualquier cambio de coloración que pudiera deberse al efecto inhibidor de alguno de los compuestos evaluados.

Oxidación del manganeso mediada por hongos

Existen muchos microorganismos, entre ellos hongos y bacterias, capaces de oxidar el manganeso. Este elemento es soluble en estado reducido (II), y al oxidarse (III y IV principalmente) genera precipitados de color negro. En este apartado se evaluó la capacidad de los hongos aislados de la cueva de Lascaux de oxidar el manganeso. Se seleccionaron principalmente cepas aisladas de muestras de manchas (capítulo 4), incluyendo algunas otras aisladas de muestras de aire en otros estudios (Porca 2011). Las cepas analizadas fueron *Alternaria* sp. LX 12L-1, *Cladosporium* sp. LX 53Y-1, *M. alpina* LX 101R-1, *G. pannorum* LX 103T-1, *G. murorum* LX 103T-4, *Penicillium* sp. LX 107X-1, *V. citrinella* LX 107X-4, *E. nigrum* LX CH22, *F. solani* LX M8-3, *I. farinosa* LX M6-2, *A. persicinum* LX M8-2, *A. nepalense* LX M1-1 y LX M6-10, *O. lascauxensis* LX A1, *O. anomala* LX CH40, *E. moniliae* LX M1-4, *E. castellanii* LX M3-3, *Herpotrichiellaceae* sp. LX M6-11 y *Exophiala* sp. LX M8-6

Las cepas se cultivaron por duplicado en placas de medio AY (acetato sódico 400 mg/l, extracto de levadura 150 mg/l, agar 15 g/l) con o sin la adición de una fuente de manganeso (MnSO_4 1 mM) (Miyata y col. 2004). Las placas se sembraron con discos de 9 mm de diámetro extraídos de cultivos en crecimiento activo en PDA, y se incubaron a 24°C durante 20

días. Tras este periodo, se evaluó el aspecto de las colonias, prestando atención a cualquier oscurecimiento de las colonias desarrolladas en el medio AY con Mn.

En aquellas especies que formaron colonias melanizadas en ambos medios de cultivo, se evaluó la presencia de depósitos de óxidos de manganeso por observación de su micelio al microscopio óptico.

Los hongos que sólo desarrollaron colonias oscuras en el medio que contenía manganeso, fueron objeto de análisis adicionales para confirmar que esta coloración se debía a la presencia de óxidos de manganeso. Su micelio se analizó por microscopía óptica y FESEM-EDS, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Adicionalmente, las especies que demostraron la capacidad de inducir la oxidación del manganeso se cultivaron en medio líquido AY-Hepes-Mn con el objeto de estudiar más detalladamente la morfología y distribución de los precipitados ricos en óxidos de manganeso. El medio de cultivo se preparó como describieron Miyata y col. (2004), con alguna modificación: tampón Hepes 20 mM (pH 7), acetato sódico 400 mg/l, extracto de levadura 150 mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50 mg/l ($=\text{MnSO}_4$ 0,18 mM), K_2HPO_4 5 mg/l, y 2 ml de una solución de sales (Composición por litro: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,7 g, H_3BO_3 2,5 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,87 g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,44 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,29 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 mg). Los cultivos se prepararon por duplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio AY-Hepes-Mn, cada uno de los cuales se inoculó con 100 μl de una suspensión de conidios ($3,2 \times 10^7$ conidios/ml). Los matraces se incubaron durante 20 días a 24°C en oscuridad y sin agitación. Tras ello, se recogieron muestras del micelio desarrollado, se secaron a 37°C durante toda la noche, y se realizaron los análisis FESEM-EDS.

Resultados y discusión

Estudio microscópico de las manchas negras

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se realizó el análisis TEM de la muestra D4, una mancha negra desarrollada sobre el sustrato arcilloso de la pared del Ábside, recogida en febrero de 2007. En la Figura 50 se muestra que las comunidades microbianas presentes en las manchas fueron complejas, con abundantes bacterias (a) y hongos (b-d).

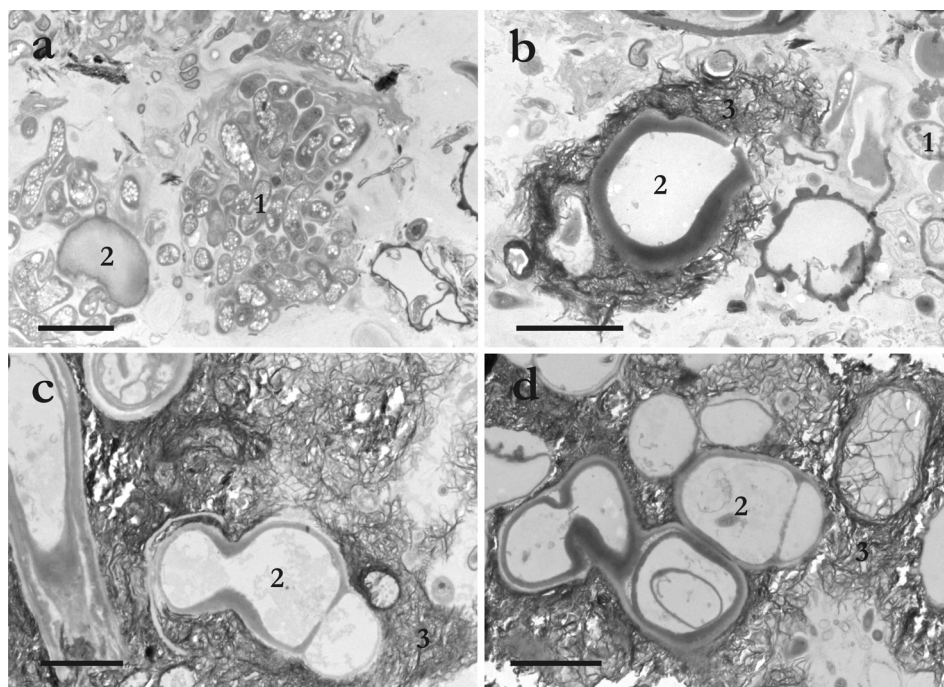


Figura 50. Imágenes TEM de la muestra D4 del Ábside. **a.** Se distinguen abundantes bacterias (1) y algunas hifas fúngicas (2). **b-d.** Se aprecian abundantes hifas fúngicas (2) con precipitados ricos en óxidos de manganeso (3) asociados a su superficie. Barras = 5 μ m.

Se observaron numerosas hifas fúngicas que presentaban unos agregados asociados a su superficie, rodeando las hifas (Fig. 50b-d). Su morfología en el análisis TEM es característica de los óxidos de manganeso (Ostwald 1984, Mita y Miura 2003), de color negro y posiblemente relacionados con la coloración de la manchas.

Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)

Estos análisis se realizaron con una muestra de mancha negra localizada sobre el sustrato arcilloso del bancal derecho del Pasaje (M2), recogida en septiembre de 2010.

En la Figura 51 se muestra que la mancha negra presentó una textura granulosa con abundantes hifas fúngicas entrelazadas con el sustrato mineral, confirmando la importancia de los hongos en la formación de las manchas. A mayores aumentos (Fig. 51b), se observó como las hifas penetraban en el sustrato mineral, fusionándose con éste a través de las sustancias extracelulares producidas por los hongos (“extracellular polymeric substances”, EPS).

Sin duda, el hallazgo más relevante de estos análisis fue que el sustrato mineral de la mancha estuvo compuesto fundamentalmente por óxidos de manganeso de origen biológico. Estos compuestos pudieron distinguirse claramente por su morfología característica, desarrollando agregados porosos formados por múltiples nano-láminas (Figs. 52a,b y 53a). Estos óxidos de color negro pueden ser la causa principal de la coloración de estas manchas. Fue frecuente encontrar estas estructuras minerales estrechamente relacionadas con hifas fúngicas (Fig. 52b), lo cual es indicativo de que la formación de estos óxidos de manganeso pudo ser inducida por alguno de los hongos presentes. Además, se distinguieron claramente abundantes EPS, con superficie lisa y aspecto mucoso en las imágenes FESEM. Estas sustancias pudieron ser secretadas por los hongos y bacterias de la muestra y aparecen frecuentemente envolviendo las formaciones minerales.

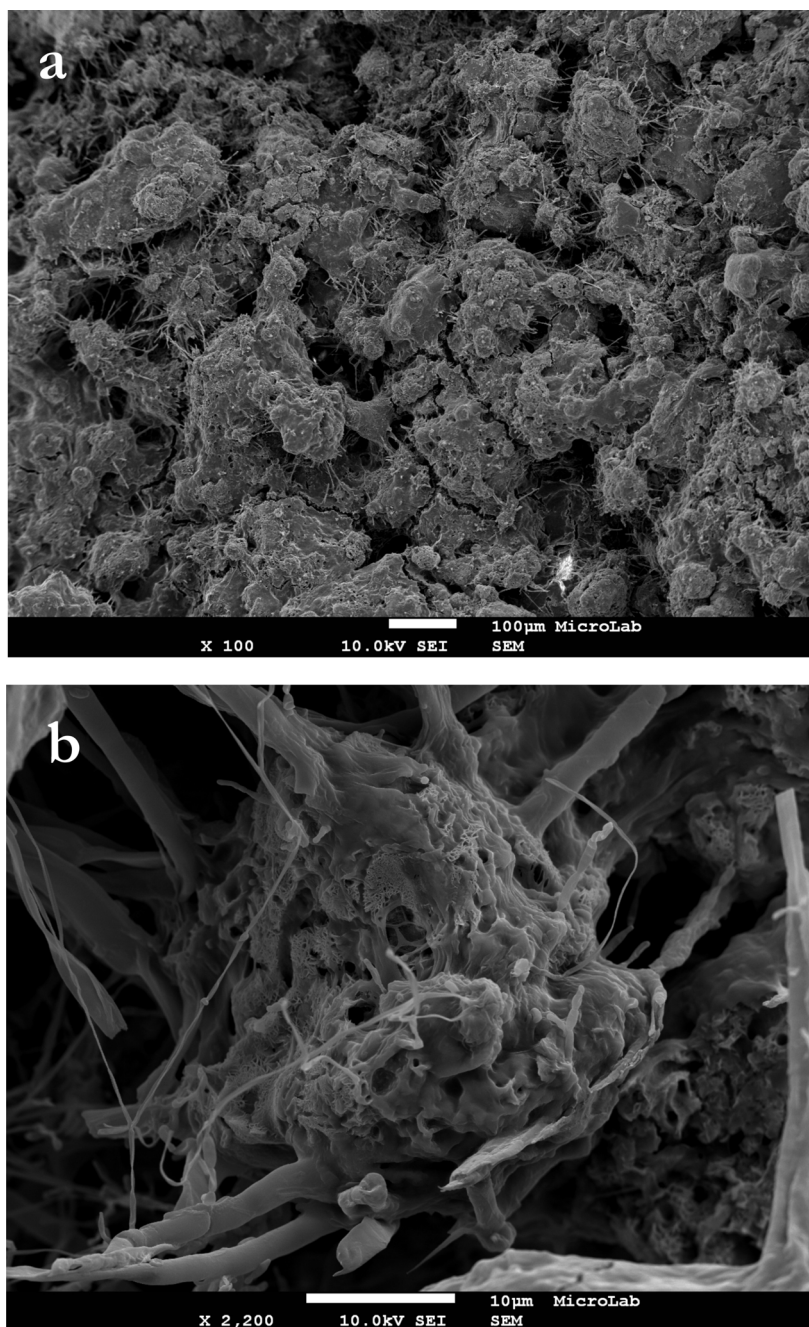


Figura 51. Imágenes FESEM de la muestra M2 del Pasaje. **a.** Aspecto general donde destacan las abundantes hifas fúngicas distribuidas por toda la muestra. **b.** Detalle de las hifas asociadas al sustrato mineral mediante sustancias extracelulares.

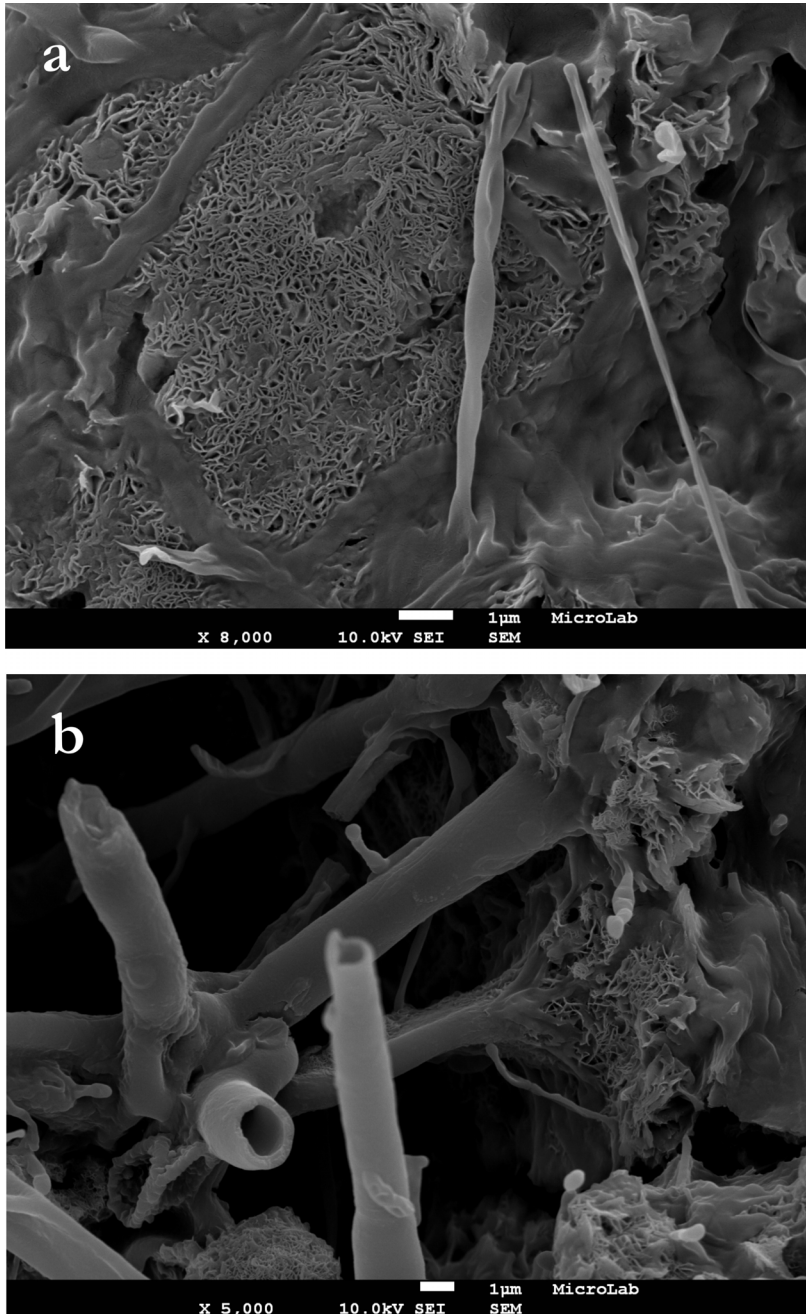


Figura 52. Imágenes FESEM de la muestra M2 del Pasaje. **a.** Forma característica de los minerales compuestos por óxidos de manganeso de origen biológico, cubiertos parcialmente por EPS. **b.** Conexión entre las hifas y los minerales formados, mediada por EPS.

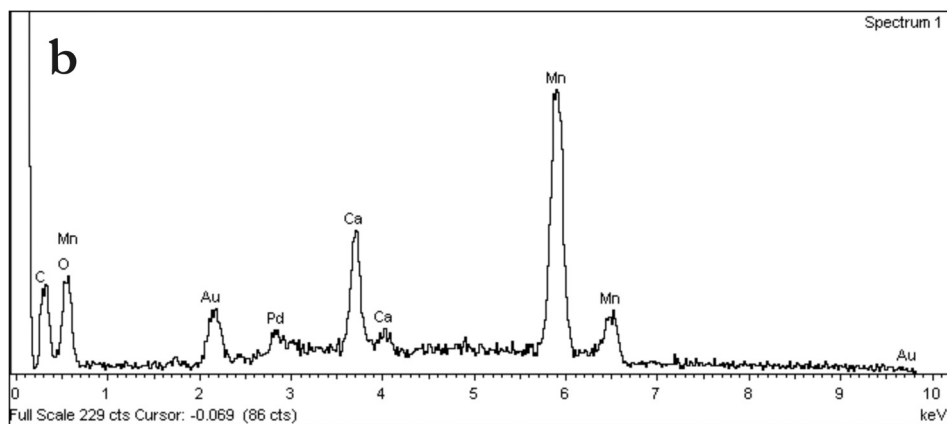
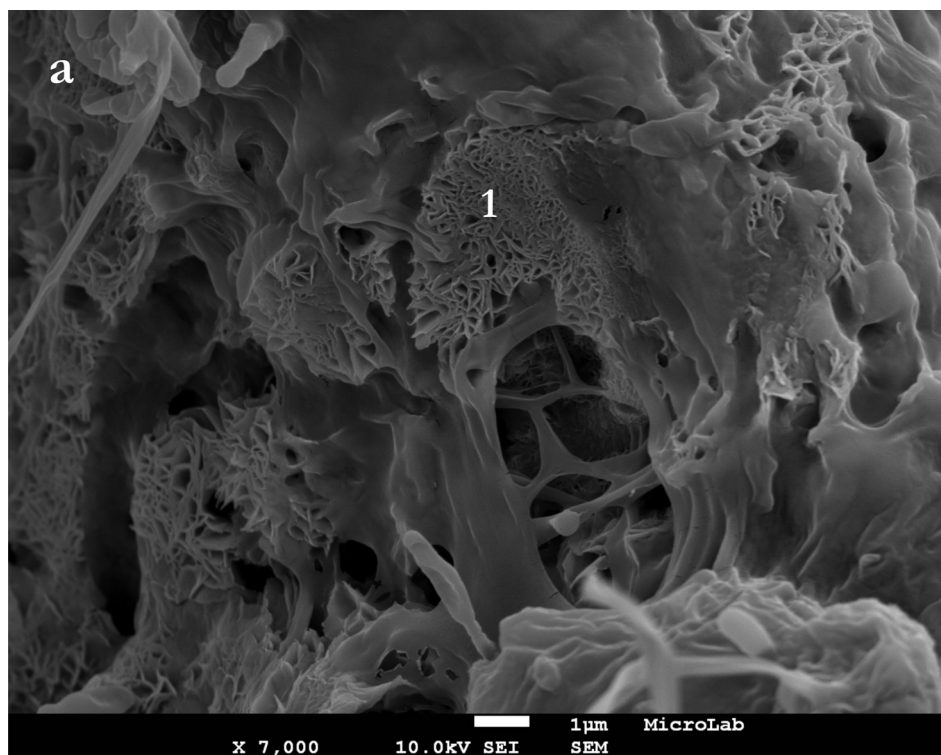


Figura 53. Imagen FESEM de la muestra M2 del Pasaje. **a.** Zona con abundantes óxidos de manganeso embebidos en las EPS. **b.** Espectro EDS focalizado en el punto 1 de la imagen, mostrando su composición elemental con elevados contenidos en Mn, Ca, O y C.

Los microanálisis EDS proporcionaron información cualitativa y semicuantitativa de su composición química. Uno de ellos, focalizado en una de estas estructuras laminares (Fig. 53a, punto 1), mostró un elevado contenido en manganeso, apareciendo sus tres picos característicos, acompañado de los elementos Ca, O y C (Fig. 53b). El calcio es muy abundante en las paredes de la cueva dada su naturaleza kárstica. El carbono y el oxígeno son indicativos de la presencia de materia orgánica. Los picos de oro y paladio son debidos a la metalización previa a la que se sometió la muestra.

Se detectaron abundantes estructuras fúngicas en esta mancha negra, alguna de las cuales se muestran en la Figura 54. No fue posible concretar la identificación de los hongos a los que pertenecen, ya que no se conocen las características necesarias para ello, como son el tipo de conidiogénesis, morfología de células conidiógenas, etc. En la muestra era especialmente abundante un tipo de conidios con superficie verruculosa de aproximadamente $5 \times 3 \mu\text{m}$ (Figs. 54a,b). También se detectaron agrupamientos de conidios similares al género *Cladosporium*, de acuerdo con la cicatriz patente que presentaron en su zona de anclaje (Fig. 54d), aunque esta identificación tampoco pudo ser confirmada por las razones ya expuestas.

Los microanálisis EDS de algunas de estas estructuras fúngicas (hifa y conidio) (Figs. 54e,f), mostraron un elevado contenido en carbono y oxígeno, elementos fundamentales de toda materia orgánica.

Se realizaron otros análisis EDS, de un modo global, sobre dos áreas seleccionadas (Figs. 55a y 56a). En ellos se obtuvo un espectro que representaba la composición elemental del área completa (Figs. 55b y 56b). Este resultado se obtuvo del sumatorio de los datos obtenidos en cada uno de sus puntos. Del mismo modo, se obtuvieron los mapas de distribución para cada uno de los elementos relevantes detectados (Figs. 55c-h y 56c-h).

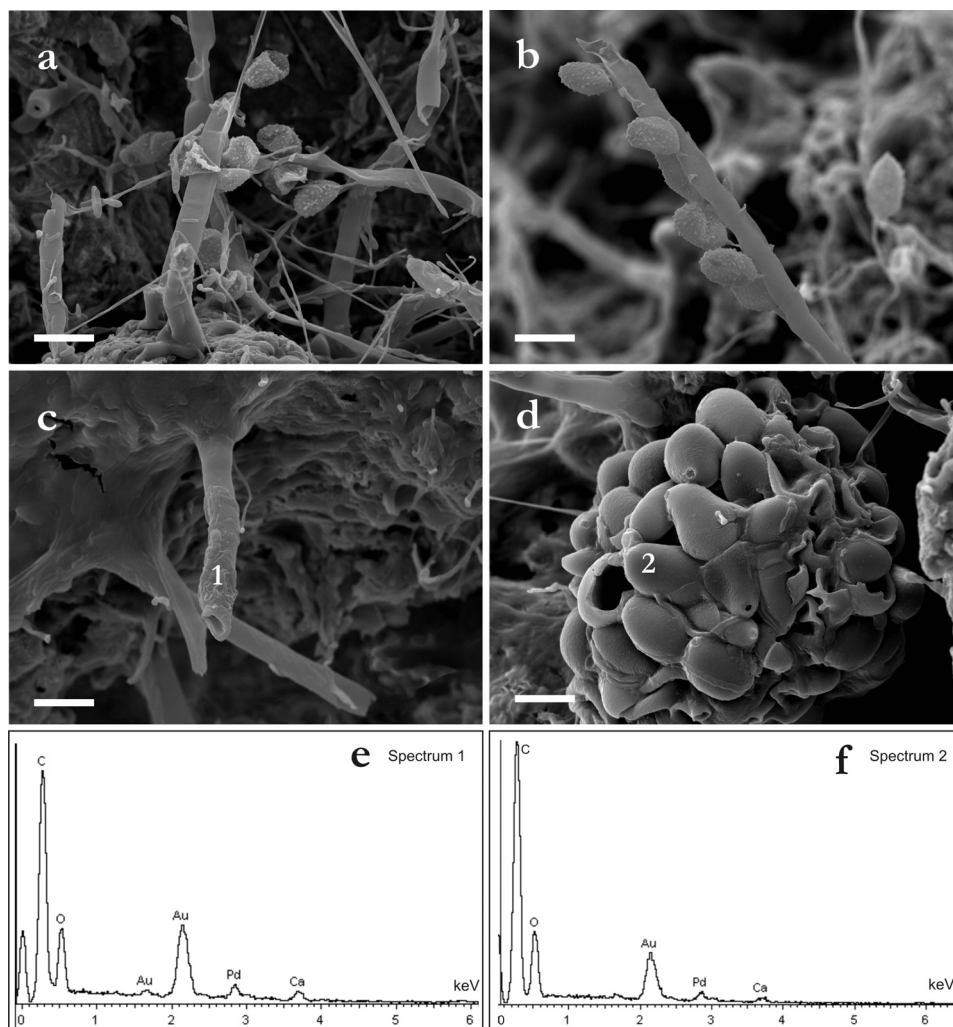


Figura 54. Imágenes FESEM correspondientes a estructuras fúngicas observadas en la muestra M2 del Pasaje. **a, b.** Hifas y conidios. **c.** Detalle de hifas asociadas a la matriz mineral, recubierta por las EPS. **d.** Agrupamiento de conidios con características similares al género *Cladosporium*. **e.** Espectro del microanálisis EDS focalizado en el punto 1 de la Fig. 54c. **f.** Espectro del microanálisis EDS focalizado en el punto 2 de la Fig. 54d. Barras = 5 μm .

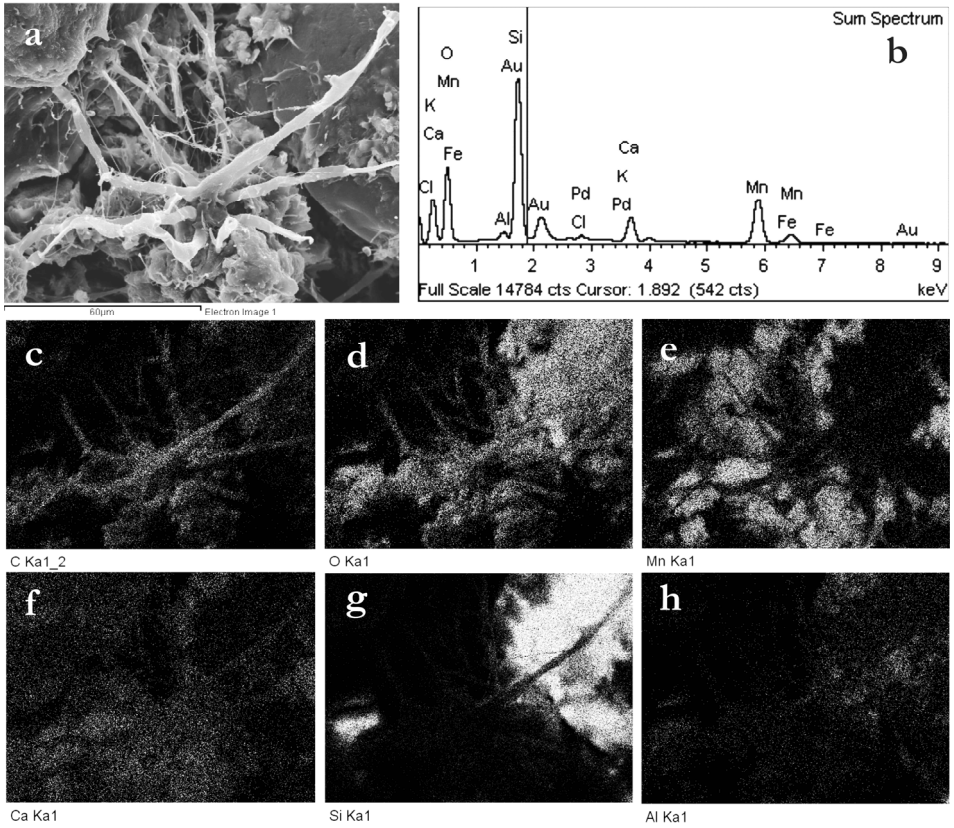


Figura 55. Análisis FESEM-EDS de la muestra M2. **a.** Imagen FESEM analizada donde se observan abundantes hifas fúngicas asociadas a un agregado mineral. **b.** Espectro EDS correspondiente a toda el área mostrada en Fig. 55a. Mapas de distribución elemental: carbono (c), oxígeno (d) manganeso (e), calcio (f), silicio (g) y aluminio (h); las zonas donde se detecta cada uno de los elementos aparecen en tonos claros.

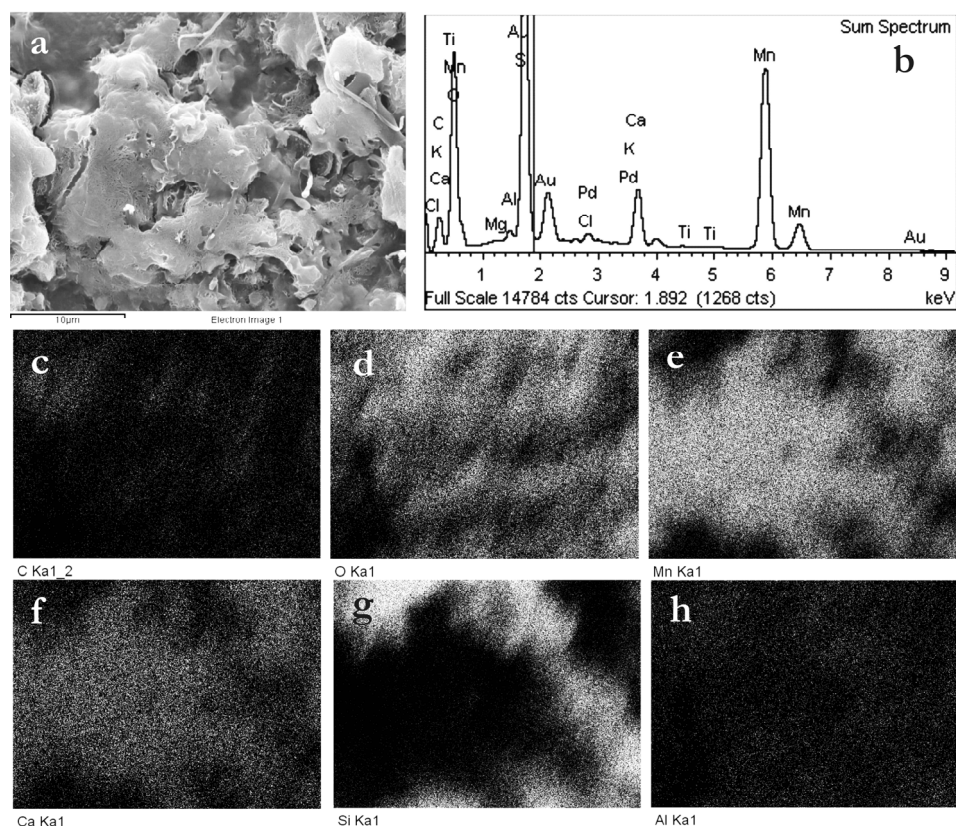


Figura 56. Análisis FESEM-EDS de la muestra M2. **a.** Imagen FESEM analizada de una región donde aparecen los típicos agregados porosos formados por múltiples nano-láminas. **b.** Espectro EDS correspondiente a toda el área mostrada en Fig. 56a. Mapas de distribución elemental: carbono (c), oxígeno (d) manganeso (e), silicio (f), calcio (g) y aluminio (h); las zonas donde se detecta cada uno de los elementos aparecen en tonos claros.

La primera ventana seleccionada corresponde a un agregado mineral asociado a numerosas hifas fúngicas (Fig. 55a). El mapa correspondiente al carbono marca la materia orgánica presente en el área de estudio (Fig. 55c), principalmente localizada en las hifas de los hongos y en parte del agregado que puede estar recubierto de EPS y bacterias. El mapa del oxígeno coincide con la materia orgánica ya marcada por el carbono, incluyendo además la zona superior derecha (Fig. 55d). Esta zona corresponde a un área de sustrato arcilloso no colonizada por la mancha negra, en la cual

aparece oxígeno, una elevada cantidad de silicio, y una cantidad bastante inferior de aluminio (Figs. 55d,g,h). Esta composición se debe a los silicatos que forman la arcilla.

En el mapa del manganeso (Fig. 55e), se marca prácticamente toda la ventana, excluyendo la zona donde aflora el sustrato arcilloso. El mapa correspondiente al calcio coincide con la zona marcada por el manganeso, aunque con una intensidad mucho menor (Fig. 55f), lo que indica que la matriz mineral de esta muestra está formada por óxidos de manganeso asociados al calcio.

La segunda ventana seleccionada corresponde a otra región de la mancha negra, donde se distinguen los típicos agregados porosos laminares (Fig. 56a). El mapa correspondiente al carbono es mucho menos intenso que en el caso anterior debido a la escasez de estructuras orgánicas evidentes, sólo aparecen algunos conidios en la parte izquierda de la imagen (Fig. 56c). Como ocurre en el caso anterior, los mapas de silicio y aluminio marcan la zona donde aflora el sustrato arcilloso (Fig. 56g,h), debido a que en ellas los agregados que componen la mancha son menores o inexistentes. El oxígeno está presente en todo el área de análisis, ya sea formando parte de los silicatos del sustrato arcilloso o de los óxidos de manganeso (Fig. 56d). Los mapas del manganeso y del calcio son coincidentes (Fig. 56e,f), cubriendo toda la zona central donde son evidentes los agregados porosos de óxidos de manganeso, lo cual indica de nuevo que el calcio es un elemento fundamental en la matriz mineral de la mancha.

Naturaleza bioquímica de las manchas negras

Análisis SERS

Para determinar la naturaleza química de las manchas negras en la cueva de Lascaux, algunas muestras recogidas de diferentes salas (Tabla 24) y la melanina de especies de *Ochroconis* se sometieron a análisis SERS. Los espectros de las melaninas de *O. lascauxensis* (Fig. 57a) y *O. tshanytschae* (no se muestra) fueron idénticos, con bandas fuertes a 1610, 1305 y 1249 cm^{-1} , que se atribuyen a las vibraciones tipo “stretching” de los enlaces C=C, C=O y C-C en los compuestos aromáticos policíclicos, y de los enlaces C-O en los polifenoles. Estas bandas pueden ser consideradas como marcadores de la melanina de *Ochroconis*.

Los espectros de las melaninas producidas por otros hongos, *Aspergillus niger* y *Stachybotrys chartarum*, exhibieron bandas diferentes comprendidas entre 1615-1510 cm^{-1} y 1380-1350 cm^{-1} (Fig. 58). Igualmente, el espectro SERS de la melanina de *O. lascauxensis* difiere de los espectros obtenidos por Centeno y Shamir (2008) para la melanina de sepia. Algunas melaninas fúngicas son generalmente sintetizadas por polimerización de fenoles (Saiz-Jimenez y col. 1975), mientras que la melanina de sepia se produce por polimerización del 5,6-dihidroxiindol (Saiz-Jimenez 1995).

En los análisis SERS de las manchas negras tomadas directamente de la cueva (2, 3, M-LX 10 y M-LX 16) (Figs. 57b y 59a-c), las tres bandas mencionadas fueron evidentes en las regiones 1600-1610, 1300-1310 y 1240-1250 cm^{-1} , lo que sugiere la presencia de melanina fúngica. Estos resultados confirmaron la participación de la melanina de *O. lascauxensis* en la formación de las manchas negras.

En los espectros SERS de las manchas negras (Fig. 59), las bandas atribuidas a cadenas alifáticas (1442-1446 cm^{-1}) y al carboxilato (1390-1400, y 930 cm^{-1}) indicaron la presencia de ácidos grasos procedentes de los microorganismos. La aparición de bandas a 1534 y 1159 cm^{-1} (asignadas al “stretching” de C=C y C-C, respectivamente) se atribuyen a los compuestos carotenoides presentes en las muestras.

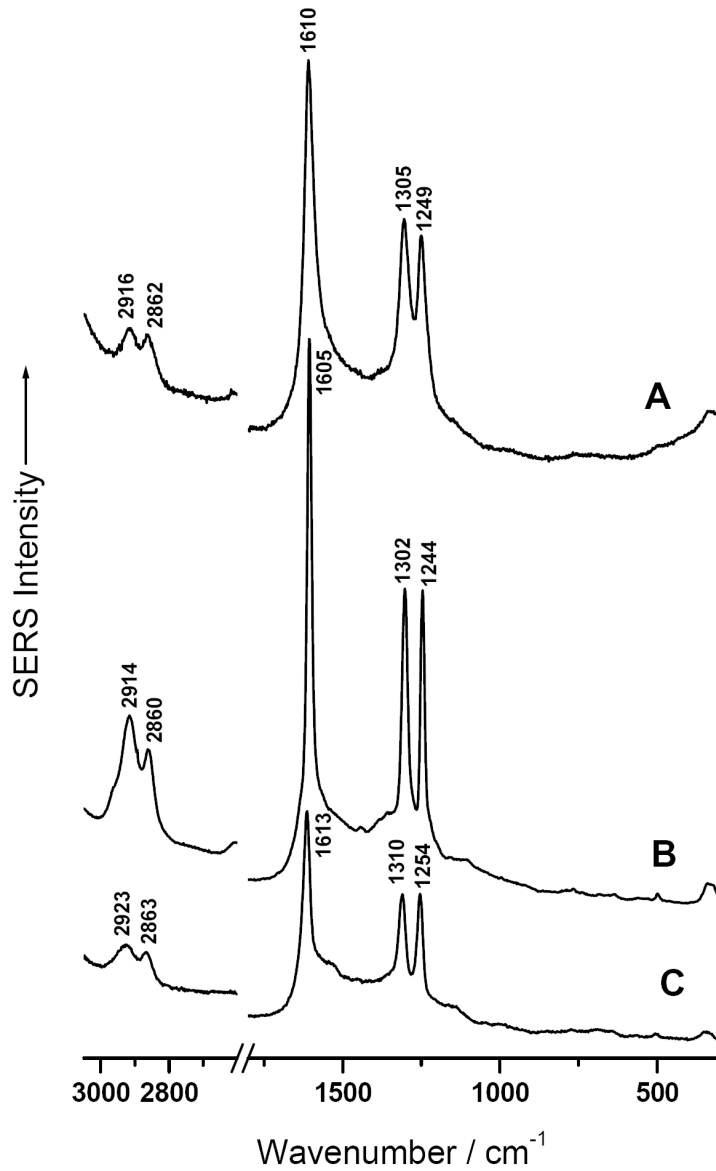


Figura 57. **a.** Espectro SERS de la melanina de *O. lascauxensis* LX A1. **b.** Espectro SERS de la mancha M-LX 10, recogida del Divertículo Axial, con abundantes colémbolos. **c.** Espectro SERS de los excrementos de individuos de *F. candida* alimentados en laboratorio con micelio de *O. lascauxensis*.

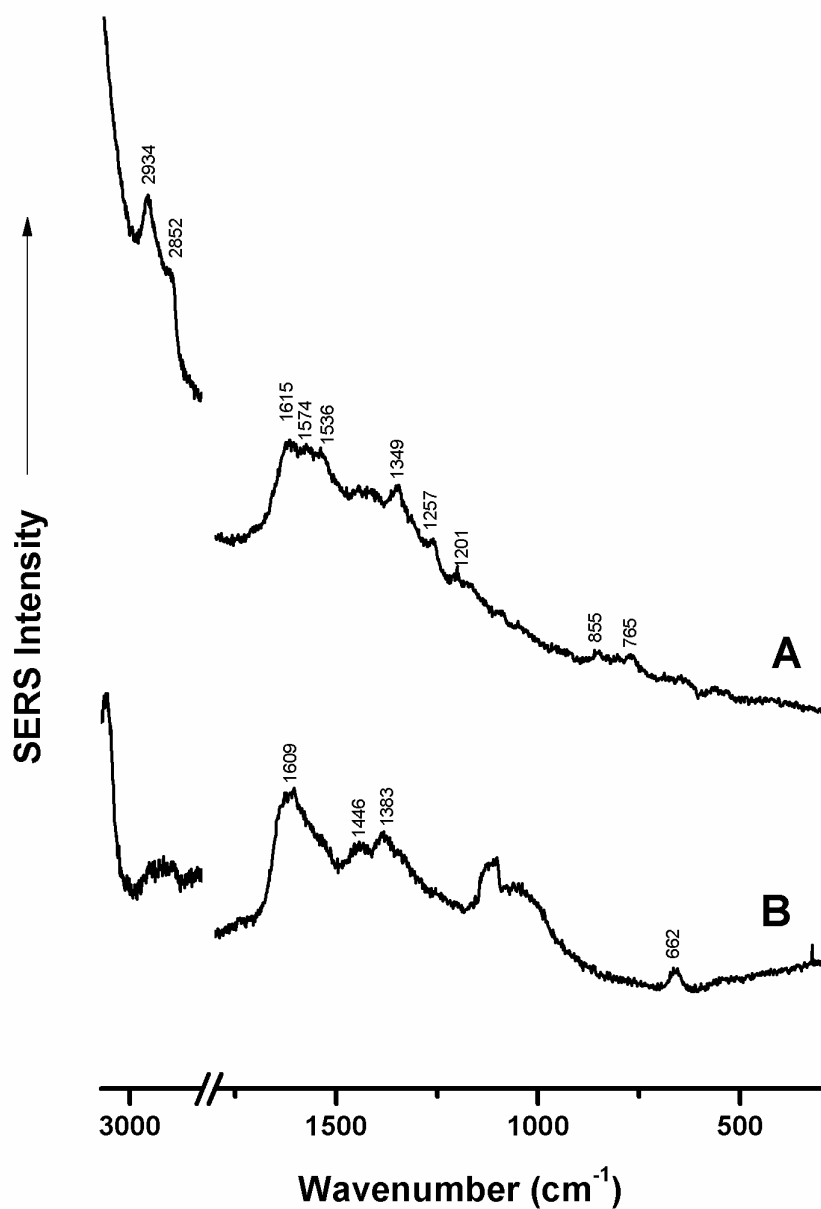


Figura 58. a. Espectros SERS de la melanina de *Aspergillus niger*. b. Espectros SERS de la melanina de *Stachybotrys chartarum*.

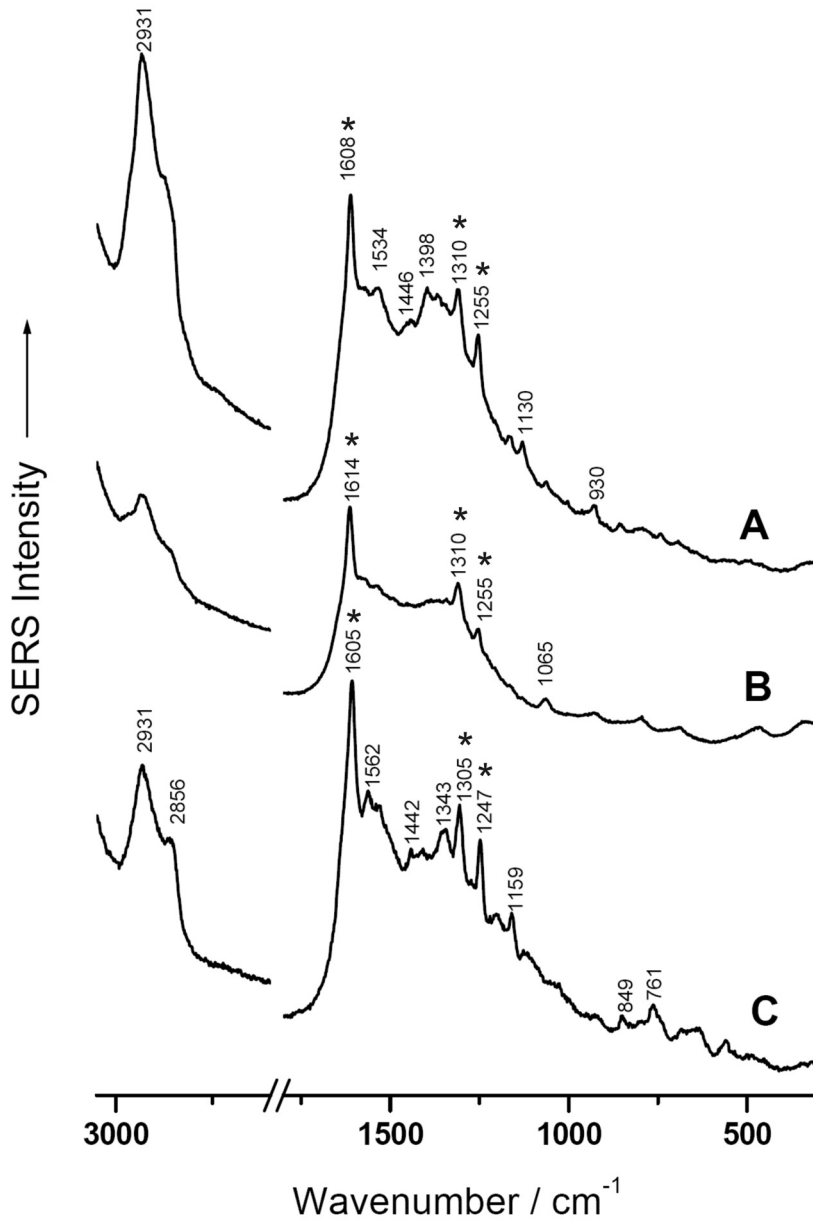


Figura 59. Espectros SERS de muestras de manchas negras de la cueva de Lascaux. **a.** Muestra 2 recogida de la Sala de los Toros. **b.** Muestra 3 recogida del Divertículo Axial. **c.** Muestra M-LX 16 recogida de la Nave. Los asteriscos muestran las bandas características de la melanina de *O. lascauxensis*.

Las bandas SERS correspondientes a los ácidos grasos no son tan intensas en relación con las de los compuestos aromáticos de la melanina, debido al elevado efecto de resonancia Raman de éstos. De hecho, este efecto de resonancia conduce a la intensificación de las bandas a 2916 y 2862 cm^{-1} , que se observaron en las manchas negras y en la melanina, las cuales corresponden a la combinación de las bandas diagnósticas que aparecen por debajo de 1800 cm^{-1} . En las muestras donde el contenido de melanina fue menor (Fig. 59) se apreció un incremento en las fracciones alifáticas y en los grupos carboxílicos (bandas a 1446, 1398 y 930 cm^{-1}), así como la banda a 2931 cm^{-1} , asignada al “stretching” C–H, fue más intensa.

Las tres bandas SERS que caracterizan la melanina de *O. lascauxensis* (Fig. 57a) son las mismas que se observaron en la mancha negra M-LX 10, abundantemente colonizada por colémbolos (Fig. 57b), mucho más intensas que las otras manchas donde no se observaron estos insectos (Fig. 59), lo que confirma que los colémbolos enriquecen las manchas en melaninas fúngicas.

En efecto, *Folsomia candida* se alimentan del micelio de *O. lascauxensis* y de otros hongos, y en su intestino se produce la digestión de los polisacáridos y las proteínas, pero no es capaz de digerir los compuestos que forman la melanina, por ello, esta melanina se libera de nuevo al medio en sus excrementos. Maraun y col. (2003) constató la existencia de melaninas fúngicas difíciles de digerir por los colémbolos. Las melaninas, al igual que los ácidos húmicos, son moléculas muy recalcitrantes que tienden a acumularse en los suelos debido a su estructura aromática y elevado peso molecular (Martin y col. 1979, Saiz-Jimenez y col. 1986). Por ello, las melaninas de *O. lascauxensis* y de otros hongos dematiáceos persisten en las paredes de la cueva como un compuesto residual que no puede ser degradado por los microorganismos. Esta hipótesis se confirma con el resultado del análisis de los excrementos de los colémbolos (*F. candida*) que habían sido alimentado con micelio de *O. lascauxensis*, ya que en su espectro SERS se observan las mismas tres bandas características de la melanina de este hongo (Fig. 57c).

La dispersión de las manchas negras en la cueva de Lascaux ya fue relacionada, en estudios anteriores (Bastian y col. 2010), con las poblaciones de colémbolos (*F. candida*) que frecuentemente aparecían alimentándose de las manchas y pueden llegar a producir nuevas manchas negras en los alrededores.

En los capítulos anteriores se ha indicado que la especie *O. lascauxensis* estaba principalmente asociada a las manchas negras de las paredes y bóvedas de roca caliza, aunque los distintos análisis realizados (PCR tiempo real y aislamientos en medios de cultivo) confirmaron que aparecía en cualquier sustrato de la cueva, pero en cantidades mucho menores.

Por lo tanto, si todas las manchas utilizadas en los análisis SERS procedían de zonas con sustrato arcilloso (Tabla 24), es lógico que las bandas diagnósticas de la melanina de *O. lascauxensis* presenten una intensidad relativamente baja (Fig. 59), proporcional a la abundancia de esta especie en este tipo de muestras. En manchas desarrolladas sobre la roca caliza sería esperable que la intensidad de las tres bandas mencionadas fuera mucho mayor. Por desgracia estos análisis no pudieron realizarse por la falta de muestras de este tipo, por las restricciones impuestas por la dirección de la cueva para el muestreo en esas áreas próximas a las pinturas.

Análisis de ácidos grasos

Se compararon los perfiles de ácidos grasos de las manchas negras y de las distintas cepas microbianas mediante un análisis de componentes principales (Fig. 60). Los ácidos grasos de las cepas fúngicas y bacterianas se separaron claramente en grupos distintos. Destaca la homogeneidad en composición de ácidos grasos que mostraron las distintas especies fúngicas, todas ellas presentaron los mismos cuatro ácidos grasos mayoritarios: 18:0 *anteiso*/18:2 ω 6,9c, 16:0 (palmítico), 18:1 ω 9c (oléico) y 18:0 (esteárico).

Las manchas negras analizadas (6 y 7) también se agrupan separándose de los hongos y bacterias. Las mezclas de los nueve hongos o de las nueve bacterias se incluyeron en sus respectivos grupos. Sin embargo,

cuando se analizó la mezcla total (bacterias y hongos), su perfil de ácidos grasos se agrupó con las dos manchas negras analizadas, lo que confirma que las manchas negras estaban compuestas por una mezcla de bacterias y hongos.

En la Figura 61 se muestran los cromatogramas de la mancha negra M2 recogida en febrero de 2010 de la banqueta derecha del Pasaje (a), la melanina de *O. lascauxensis* LX CH16 (b), y los excrementos de *F. candida* (c).

En las melaninas de *O. lascauxensis* (LX A1 y LX CH16) y *O. tshanytschae* (CBS 100438) se detectaron los mismos ácidos grasos que fueron mayoritarios en todos los hongos analizados.

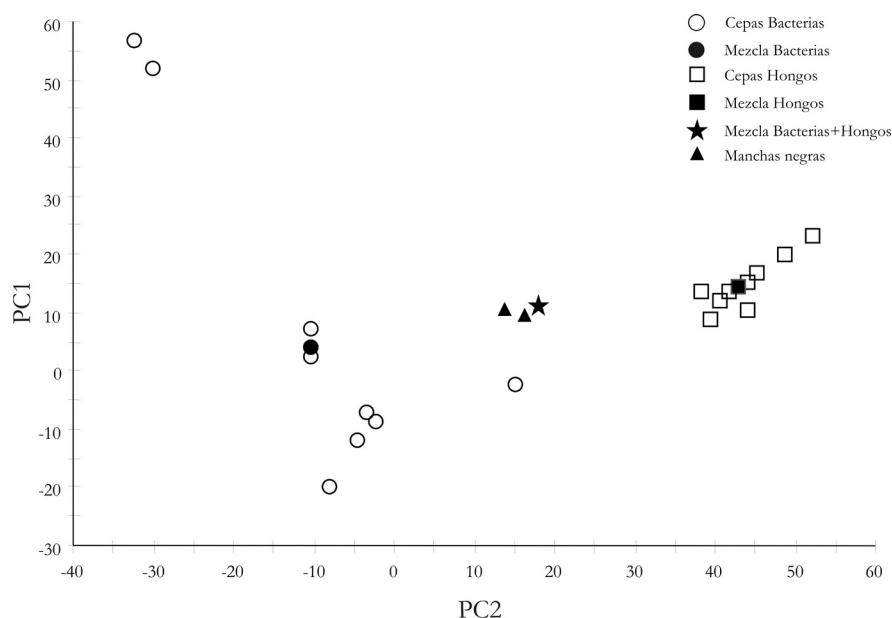


Figura 60. Análisis de componentes principales de los perfiles de ácidos grasos. Se incluyen dos muestras de manchas negras (6 y 7) recogidas del Ábside; bacterias de los generos *Acrobacterium*, *Ochrobactrum*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Achromobacter* y *Pseudomonas*; y los hongos *O. lascauxensis*, *A. nepalense*, *G. pannorum*, *E. castellanii*, *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *I. farinosa*, *V. citrinela* y *G. murorum*. Adicionalmente se analizaron mezclas de bacterias, de hongos, y de ambos grupos. Se muestra una de las tres réplicas analizadas para cada muestra.

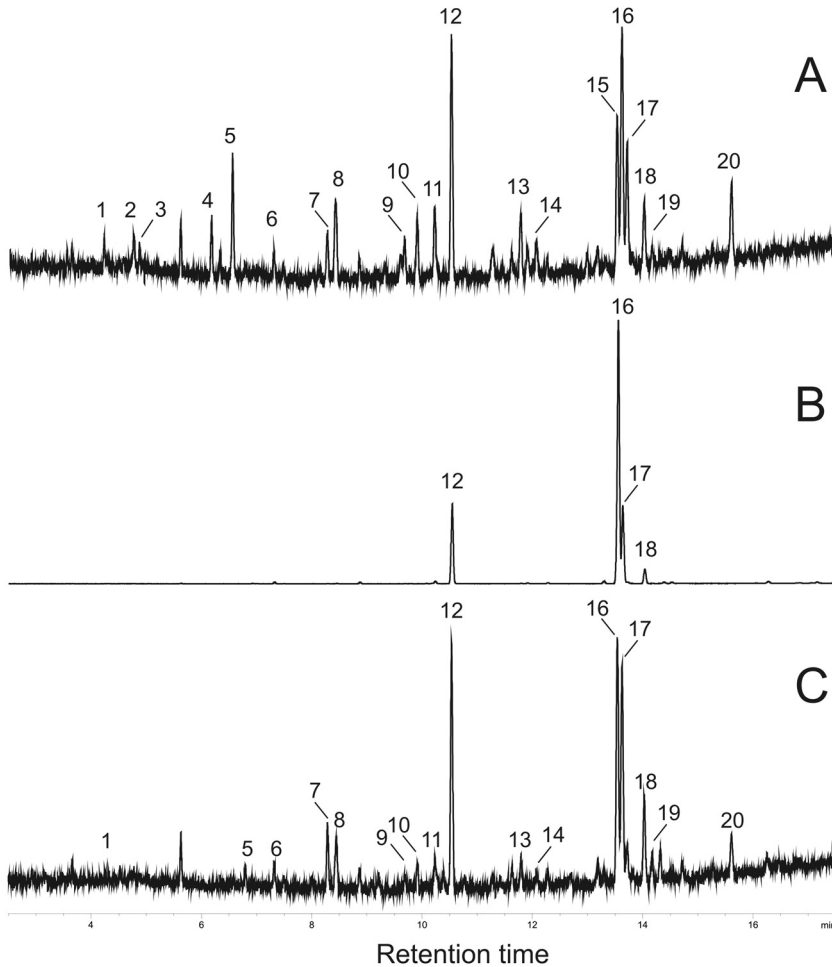


Figura 61. Cromatogramas de ácidos grasos. **a.** Mancha negra M2 recogida en febrero de 2010 del Pasaje. **b.** Melanina de *O. lascauxensis* LX CH16. **c.** Excrementos de *F. candida* alimentada con micelio de *O. lascauxensis* (LX CH16). Identificación de picos: 10:0 3OH (1); 12:0 (2); 11:0 iso 3OH (3); 12:0 2OH (4); 12:0 3OH (5); 14:0 (6); 15:0 iso (7); 15:0 anteiso (8); 16:1 iso (9); 16:0 iso (10); 16:1 iso I/14:0 3OH (11); 16:0 (12); 17:0 anteiso (13); 17:0 ciclo (14); 18:2 ω 6,9c/18:0 anteiso (15); 18:1 ω 9c (16); 18:1 ω 7c (17); 18:0 (18); 11 metil 18:1 ω 7c (19); 19:0 ciclo ω 8c (20).

Los perfiles de ácidos grasos de la mancha y los excrementos de los colémbolos fueron bastante similares en su composición, correspondiente a una mezcla de ácidos grasos de diferentes microorganismos (hongos y bacterias). Estos resultados coinciden con lo establecido en el ensayo anterior (Fig. 60). En la muestra de excrementos los principales ácidos grasos encontrados son de origen fúngico debido a la dieta de los colémbolos, basada en micelios de *O. lascauxensis*. Sin embargo, también aparecen ácidos grasos de origen bacteriano que pueden proceder de la flora intestinal de los insectos (17:0 ciclo y 19:0 ciclo ω 8c; picos 14 y 20, Fig. 61).

Ensayo de inhibición de la biosíntesis de melanina

Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 62. Ninguno de los hongos analizados fue sensible a los inhibidores ensayados (triciclazol y ácido kójico), al menos bajo las condiciones experimentales ensayadas. Es decir, las melaninas producidas por ellos no están basadas en los precursores DHN ni DOPA. El único efecto apreciable fue que las colonias de *E. castellanii* en presencia del triciclazol produjeron un pigmento difusible al medio de cultivo (Fig. 62e,f). Por otro lado, conviene destacar que las colonias de *A. nepalense* y *G. murorum* melanizaron muy débilmente tras 75 días de cultivo (Fig. 62g,h).

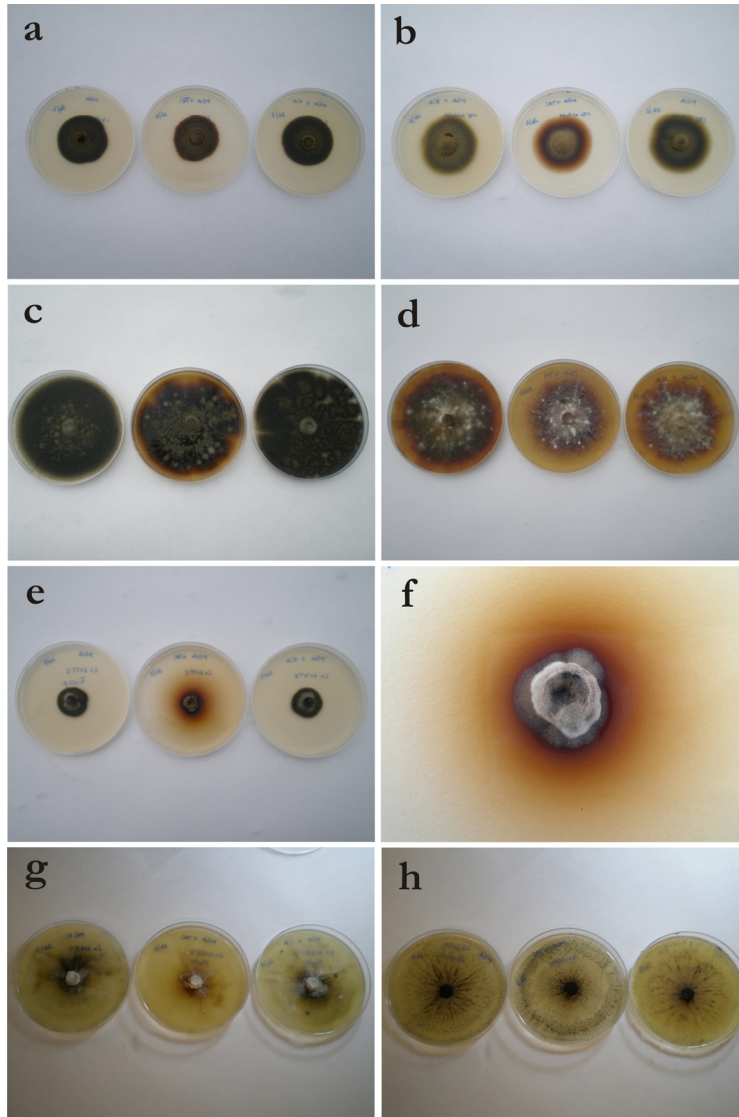


Figura 62. Ensayo de inhibición de la síntesis de melanina fúngica. **a.** *O. lascauxensis* LX A1, 36 días. **b.** *O. tschamyttschae* CBS 100438, 36 días. **c.** *Cladosporium* sp. LX 53Y-1, 36 días. **d.** *E. nigrum* LX CH22, 36 días. **e.** *E. castellanii* LX 103T-5, 36 días, se muestra en detalle el pigmento difusible que se produce en presencia de triciclazol (**f**). **g.** *A. nepalense* LX 101R-3, 75 días. **h.** *G. murorum* LX103T-4, 75 días. Posición: placa control de MEA sin aditivo (izquierda), MEA más inhibidor de melanina DHN (triciclazol, 30 mg/l) (centro) y MEA más inhibidor de melanina DOPA (ácido kójico, 30 mg/l) (derecha).

Oxidación del manganeso mediada por hongos

Dada la abundancia de óxidos de manganeso detectada en el análisis FESEM-EDS de la mancha negra M2, se evaluó la capacidad de los hongos aislados de la cueva de Lascaux para oxidar el manganeso, cultivándolos en medio AY con o sin sulfato de manganeso. De las 18 especies de hongos seleccionadas, sólo la especie *A. nepalense* desarrolló colonias con coloración distinta según la composición del medio (Fig. 63b). El resto de especies no mostraron ningún cambio significativo de coloración en los distintos medios de cultivo (sin/con Mn) (Fig. 63a,c,d).

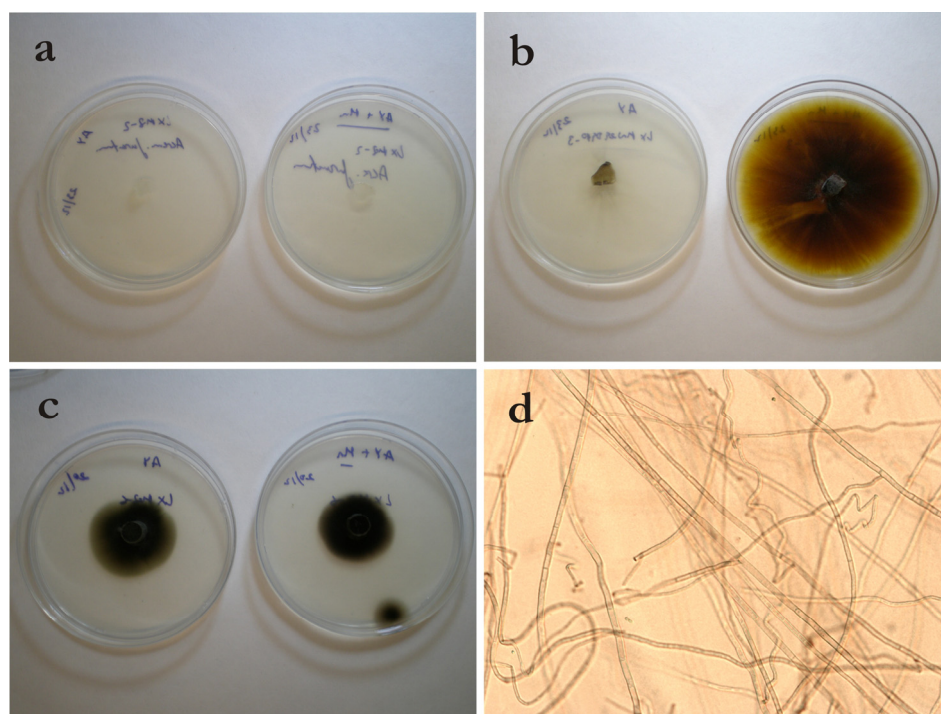


Figura 63. Evaluación de la capacidad de oxidar de manganeso de los hongos aislados de la cueva de Lascaux en medios AY (izquierda) y AY+Mn (derecha). **a.** *A. persicinum* LX M8-2. **b.** *A. nepalense* LX M6-10. **c.** *Exophiala* sp. LX M8-6. **d.** Detalle a microscopía óptica del micelio de la cepa LX M8-6 en medio AY+Mn.

Algunos hongos, debido a su naturaleza, desarrollaron colonias melanizadas independientemente del medio de cultivo utilizado (Fig. 63c), como es el caso de las especies de *Ochroconis*, “levaduras negras”, *Cladosporium* y *Penicillium*. En sus cultivos en medio AY+Mn se confirmó la ausencia de óxidos de manganeso precipitados sobre sus hifas, observando su micelio con el microscopio óptico (Fig 63d).

Las dos cepas evaluadas de *A. nepalense* (LX M1-1 y LX M6-10) desarrollaron colonias con diferente coloración según la composición del medio de cultivo. En el medio con Mn, las colonias crecieron inicialmente con un color blanco y a los 4-5 días de cultivo mostraron un color marrón oscuro (Figs. 63b y 64b). Sin embargo, en ausencia de Mn, las colonias mantuvieron su coloración inicial incluso tras meses de cultivo (Fig. 63b y 64a). Observando su micelio al microscopio óptico y electrónico de barrido (FESEM), se puso de manifiesto que en presencia de Mn aparecían abundantes agregados distribuidos por el medio de cultivo, y especialmente asociados a la superficie de las hifas (Fig. 64d,f). De acuerdo con la morfología de los agregados en el análisis FESEM (Fig. 64f), éstos deben estar compuestos fundamentalmente por óxidos de manganeso.

Los microanálisis EDS de los cultivos proporcionaron información de su composición química. Como muestra la Figura 65a, las hifas crecidas en el medio con Mn presentaron en su superficie, y en sus alrededores, una elevada cantidad de agregados minerales. Los mapas de distribución de los elementos carbono, oxígeno y manganeso demuestran que estos agregados estaban compuestos fundamentalmente por óxidos de manganeso, cuya formación es claramente inducida por el hongo.

Los análisis FESEM-EDS, de las muestras de micelio de *A. nepalense* (LX M1-1) en cultivo líquido AY-Hepes-Mn, pusieron de manifiesto la completa mineralización de las hifas, que aparecieron totalmente recubiertas de agregados ricos en óxidos de manganeso, asociados a abundantes sustancias EPS (Fig. 66).

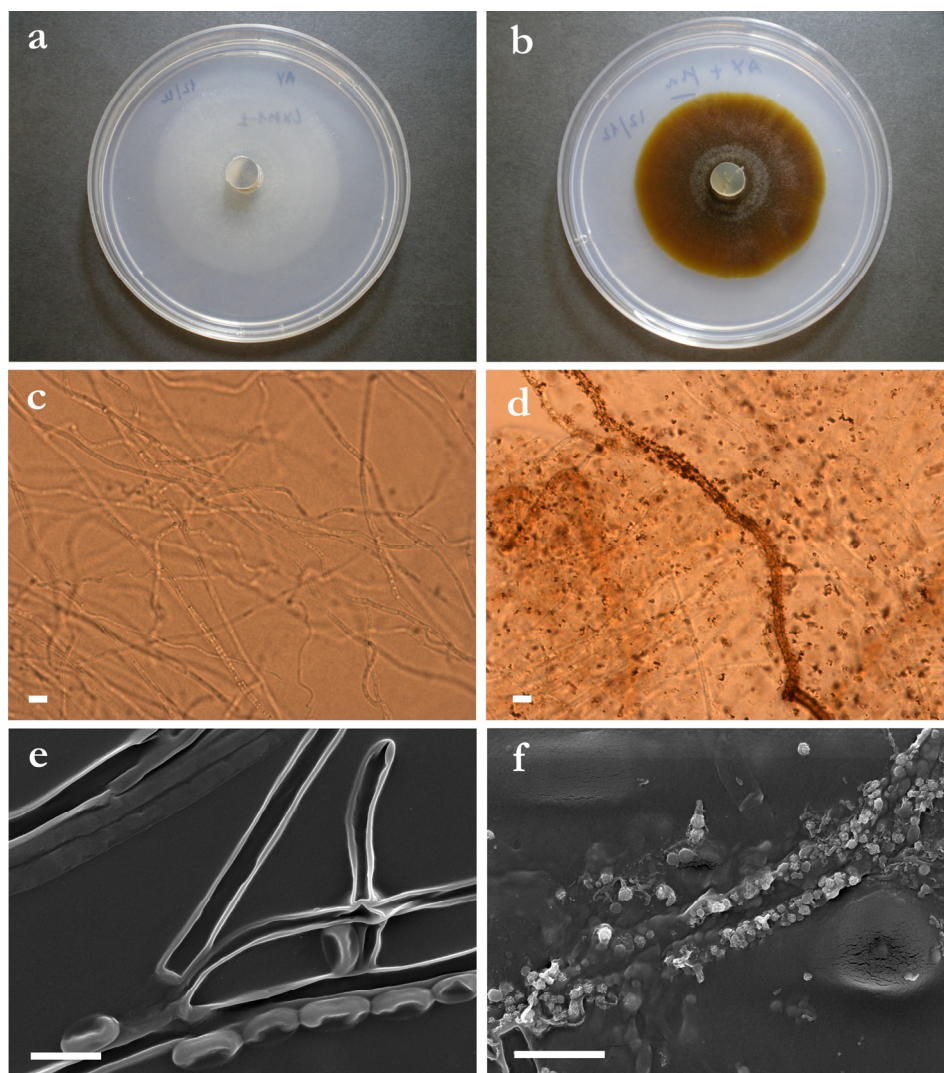


Figura 64. Cultivos de *A. nepalense*, cepa LX M1-1, en medios AY (izquierda) y AY+Mn (derecha). **a, b.** Colonias desarrolladas tras diez días de crecimiento. **c, d.** Aspecto del micelio a microscopía óptica. **e, f.** Detalles de las hifas a microscopía electrónica de barrido, micrografías a 10 kV. Barras = 5 μm.

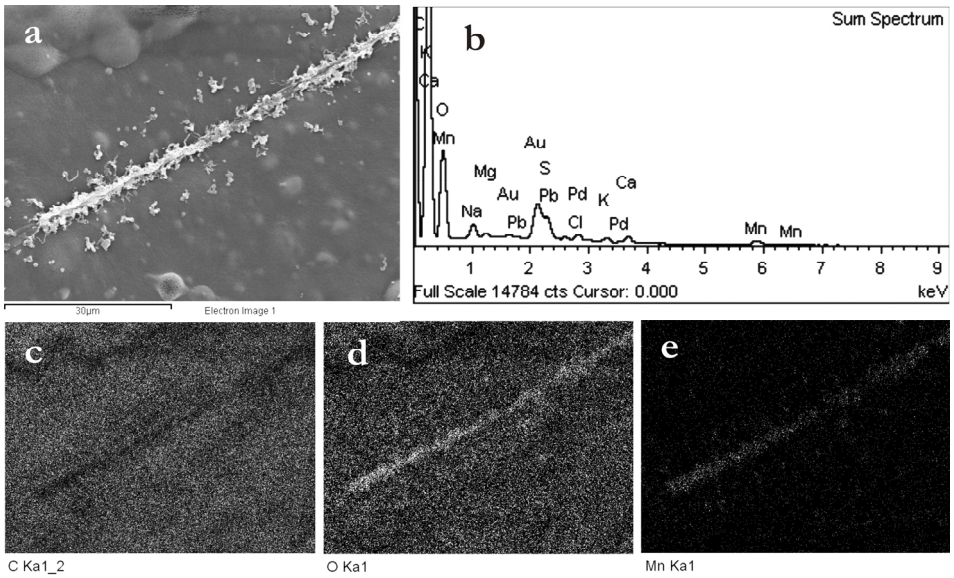


Figura 65. Análisis FESEM-EDS de una hifa de *A. nepalense* (LX M1-1). Cultivo de diez días en AY+Mn, donde se aprecian los óxidos de manganeso precipitados alrededor de su superficie. **a.** Imagen FESEM analizada. **b.** Espectro EDS correspondiente a toda el área mostrada en Fig. 65a. **c-e.** Mapas de distribución elemental: carbono (c), oxígeno (d) y manganeso (e); las zonas donde se detecta cada uno de los elementos aparecen en tonos claros.

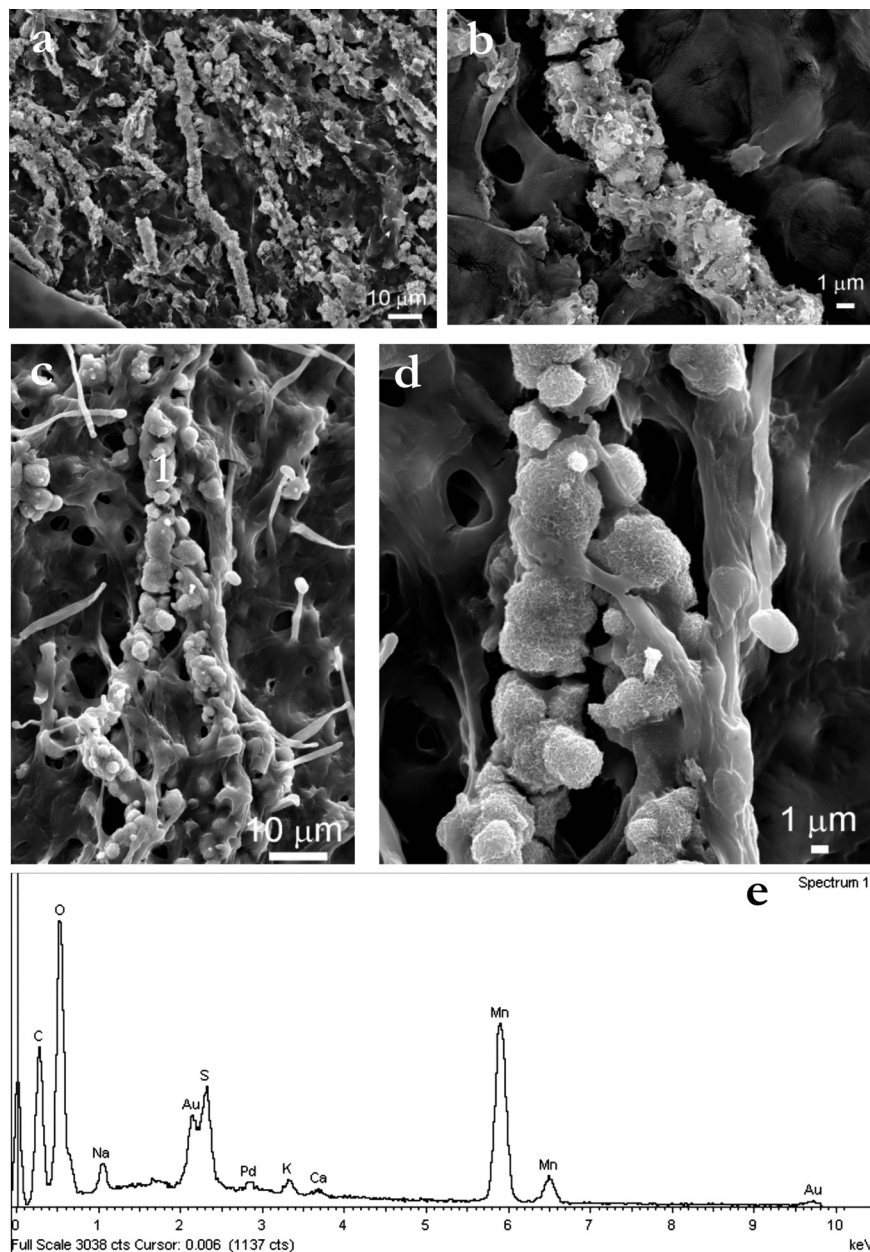


Figura 66. Análisis FESEM-EDS del micelio de *A. nepalense* (LX M1-1) en cultivo líquido, 20 días en AY-Hepes-Mn. **a.** Visión general del micelio totalmente mineralizado. **b-d.** Detalles de los óxidos de manganeso depositados en la superficie de las hifas, y su asociación con EPS **e.** Espectro del microanálisis EDS focalizado en el punto 1 de la Fig. 66c.

Origen de las manchas negras sobre sedimentos arcillosos

Las manchas negras D4 (2007) y M2 (2010), analizadas por microscopía, tuvieron características similares, en relación al tipo de sustrato y aspecto, con respecto a la mayoría de las manchas analizadas en este estudio (M1, M4, M5, M6 y M8, entre otras), siendo representativas del conjunto de manchas que aparecen cubriendo los sedimentos arcillosos de bancos y paredes de la cueva de Lascaux.

Los análisis TEM y FESEM-EDS demostraron que el sustrato mineral de estas manchas negras estaba compuesto principalmente por óxidos de manganeso de origen biológico, causa principal de su coloración negra. Estos agregados se describen en la bibliografía con el término “manganese oxide wads” (Ostwald 1984, Mita y Miura 2003) (Figs. 52a y 53a). Las características estructurales que mostraron en los análisis FESEM habían sido descritas anteriormente para los óxidos de manganeso biogénicos (Spilde y col. 2005, Miyata y col. 2006, Feng y col. 2010, Santelli y col. 2011). La morfología de estos depósitos en el análisis TEM (Fig. 50b-d) también coincide con la descrita por otros autores, Miyata y col. (2006) caracterizaron los óxidos de manganeso producidos por *Acremonium* sp., y Saratovsky y col. (2006) los producidos por la bacteria *Leptothrix discophora*. Frierdich y col. (2011) también encontraron óxidos de manganeso biogénicos formando depósitos negros en cuevas.

Las comunidades microbianas de las manchas negras son muy abundantes y diversas, compuestas principalmente por hongos y bacterias, como se comprobó en los aislamientos en medios de cultivo (Tabla 20, Fig. 40a,b). Los resultados de microscopía TEM de la mancha D4 (Fig. 50), y los análisis de ácidos grasos de las manchas y cepas aisladas (Fig. 60), confirman esta doble composición microbiana.

En la muestra analizada por microscopía FESEM aparecieron abundantes hongos estrechamente asociados con los agregados minerales, indicando que la síntesis de los óxidos de manganeso pudo estar inducida por éstos. Las abundantes EPS encontradas facilitan la adhesión de las

células microbianas, hifas fúngicas y bacterias, al sustrato lítico. Su composición química y propiedades físicas varían sustancialmente según los microorganismos que las produzcan, estando fundamentalmente compuestas de polisacáridos, ácidos grasos, proteínas y enzimas (Krumbein y Urzì 1991, Kawaguchi y Decho 2002, Young y col. 2008).

Las bacterias y hongos que oxidan el manganeso están muy extendidas en la naturaleza y han sido descritas en muchos ambientes (Tebo y col. 2004). Son bien conocidas algunas bacterias que mineralizan activamente estos compuestos, tales como *Leptothrix discophora*, *Pseudomonas putida*, *Pedomicrobium* sp., *Bacillus* spp., etc. En los últimos años se ha incrementado notablemente la identificación de especies con estas propiedades, quedando claro que esta capacidad está ampliamente distribuida entre las bacterias (Tebo y col. 2004 y 2005). Del mismo modo, la oxidación del manganeso mediada por hongos puede ser igual o más importante (Santelli y col. 2011). Diversos estudios apuntan que la oxidación de Mn (II) a Mn (IV) está catalizada por una enzima oxidasa (Miyata y col. 2006, Tebo y col. 2004 y 2005).

Se ha descrito que especies de los géneros *Acremonium*, *Plectosphaerella*, *Pyrenochaeta*, *Stagonospora*, *Phoma*, *Coniothyrium* y *Cladosporium* son capaces de oxidar el manganeso (Bromfield y Skerman 1950, Timonin y col. 1972, Miyata y col. 2004, Takano y col. 2006, Cahyani y col. 2009, Santelli y col. 2011). El cultivo de las principales especies de hongos aisladas de las manchas negras en medios con MnSO_4 (AY+Mn) corrobora que *A. nepalense* participa de un modo activo en la formación de las manchas, induciendo la oxidación del Mn (II) a óxidos de Mn (III, IV) (Fig. 64-66), componente mayoritario de las manchas negras desarrolladas sobre sedimentos arcillosos. En los estudios anteriormente expuestos (capítulo 4), esta especie se detectó de un modo abundante y metabólicamente activa en este tipo de manchas, de acuerdo con los análisis moleculares (DGGE y genotecas) y aislamientos en medio de cultivo. Teniendo en cuenta que *A. nepalense* es capaz de oxidar el manganeso, la causa de la coloración de las manchas negras sobre sedimentos arcillosos tendría este origen, al igual que en los

cultivos, la coloración negra se debe a la oxidación del MnSO_4 que contiene el medio. Este mismo proceso es el responsable de la coloración de las colonias de *A. nepalense* desarrolladas en medio ECA (MnSO_4 0,4 mg/l).

Los microanálisis EDS de los agregados minerales de las manchas negras sugieren que el calcio se asocia con los óxidos de manganeso, por lo tanto, el mineral que aparece en este tipo de manchas puede que sea rancieita, pero para confirmarlo serían necesarios análisis adicionales. La rancieita es un filomanganato de la familia de las birnesitas, de color negro, marrón o violeta, su estructura consta de capas desordenadas de octaedros de MnO_6 o $\text{Mn}(\text{OH})_6$, con el Ca como catión principal localizado entre las capas. Este mineral se encontró por primera vez en la mina Rancié, Vicedessos, Pirineo francés (Ertl y col. 2005). En la cueva de Lascaux también son frecuentes las manchas de color negro-rosa a violeta, como la mancha M3 incluida en este estudio. Se sugiere que esta coloración pudiera ser indicativa de la presencia de rancieita.

Se puede concluir que la precipitación de los óxidos de manganeso biogénicos, en las manchas negras de sedimentos arcillosos, se debe a la biomineralización mediada por los hongos o bacterias presentes en la cueva. Aunque hasta el momento sólo se ha asociado a este fenómeno el hongo *A. nepalense*, debería profundizarse en el tema para detectar otros microorganismos que pudieran estar implicados en este proceso.



CAPÍTULO 6

CONSIDERACIONES FINALES

Y CONCLUSIONES

Consideraciones finales

Los datos mostrados en esta Tesis Doctoral indican que el fenómeno de las manchas negras de la cueva de Lascaux tiene un doble origen según el sustrato donde aparecen.

Las manchas negras que se desarrollan sobre las paredes y bóvedas de roca caliza se producen principalmente por la acumulación de melanina fúngica. La principal especie implicada sería *O. lascauxensis*, de acuerdo con los resultados de los aislamientos en medio de cultivo, caracterización molecular de las comunidades (DGGE y genotecas), y los análisis SERS. Adicionalmente, las melaninas de otros hongos dematiáceos, como por ejemplo *O. anomala*, *G. murorum*, etc., podrían estar participando en la formación de este tipo de manchas.

Las manchas negras que aparecen sobre las paredes y bancos laterales de sedimentos arcillosos se producen fundamentalmente por la deposición biogénica de óxidos de manganeso. Se ha demostrado la participación en este proceso de la especie *A. nepalense*, asociada a este tipo de manchas con una abundancia significativa según los aislamientos en medio de cultivo y la caracterización molecular de las comunidades (DGGE y genotecas). Es posible que existan en la cueva otros hongos y/o bacterias implicados en esta biomineralización.

Aunque la oxidación del manganeso es la causa principal de la coloración de este tipo de manchas, no se puede descartar la participación de algunas melaninas de origen fúngico. En este sentido, conviene recordar que *O. lascauxensis* está presente en estas muestras, aunque representa un grupo minoritario. Todas las manchas analizadas con la técnica SERS mostraron las tres bandas diagnósticas de la melanina de *O. lascauxensis*, y especialmente la mancha densamente pobladas de colémbolos. En la actualidad, las especies de “levaduras negras” representan la comunidad fúngica mayoritaria en este tipo de manchas. Las líneas futuras de investigación deberían orientarse hacia estas “levaduras negras” con el fin de averiguar el papel que desempeñan en la formación de las manchas negras,

así como caracterizar sus melaninas y evaluar su contribución a este fenómeno.

En resumen, en el presente estudio se han determinado como se forman las diferentes manchas negras, se han identificado los principales hongos implicados, y se han discutido las razones que pudieron originar el brote y su dispersión. Estos resultados deberían ser considerados por el equipo encargado de la conservación de la cueva, para establecer las pautas de control adecuadas que eviten la propagación del brote.

No es posible proponer una solución concreta al problema de las manchas negras de la cueva de Lascaux. El ecosistema de la cueva ha sido totalmente alterado por las distintas intervenciones realizadas desde su descubrimiento: obras de adaptación, visitas turísticas, diferentes sistemas de regulación climática y continuos tratamientos biocidas. Actualmente, las comunidades microbianas de la cueva no tienen relación con las que existían antes de su descubrimiento, ya que los numerosos impactos antropogénicos han seleccionado unas comunidades que no parecen haber alcanzado aún su equilibrio ecológico. Es imposible predecir cómo evolucionarán estas comunidades, a corto, medio o largo plazo; cuándo alcanzarían el equilibrio si cesan las intervenciones, y ni siquiera, si este equilibrio comprometería la conservación del patrimonio de la cueva.

La cueva de Lascaux, a pesar de su interés y de los años de estudios a los que ha sido sometida, era una gran desconocida hasta el año 2009, en lo que respecta a su microbiología y ecología microbiana. Los estudios realizados en esta tesis presentan una visión global del ecosistema. Solo el conocimiento de qué sucede en la cueva y por qué sucede puede facilitar la comprensión de las pautas de comportamiento microbiano para poder abordar la conservación de la cueva desde un punto de vista lógico.

La lección que se debe extraer de los problemas de la cueva de Lascaux, es que estos hábitats subterráneos son complejos y no pueden tratarse con productos o recetas que los restauradores aplican en otros casos (por ejemplo pinturas murales y frescos localizados en una iglesia). Por otra

parte, los bienes del Patrimonio Cultural no pueden ser tratados con biocidas de uso industrial, que si bien han sido ensayados convenientemente en el laboratorio y en determinados procesos industriales (eliminación de películas microbianas en conducciones o tuberías) nunca pueden ser de aplicación al Patrimonio. La extendida creencia, muchas veces basadas en la ignorancia, de que un producto biocida puede ser aplicado con carácter general ha dado lugar a daños irreversibles en la cueva.

Los planes de conservación del Patrimonio requieren un cuidadoso estudio preliminar sobre las posibles ventajas y desventajas de la aplicación de biocidas. Cualquier tratamiento químico debe ser previamente ensayado en laboratorio, así como en condiciones de campo, con el fin de seleccionar un tratamiento biocida eficaz. Incluso obteniendo resultados satisfactorios en este tipo de ensayos, los tratamientos biocidas no son recomendables en las cuevas con pinturas rupestres por diversos motivos: la presencia de biopelículas complejas dificulta la accesibilidad del biocida, y se prevé una rápida inactivación debida a factores bióticos (Langsrud y col. 2003, McBain y col. 2004, Bastian y col. 2009b) y abióticos (Tezel y Pavlostathis 2009). Por lo tanto, lo más probable es que el tratamiento resulte ineficaz, y además pueda ocasionar un daño mayor e irreversible al ecosistema, como ocurrió en la cueva de Lascaux.

Conclusiones

Los resultados del trabajo desarrollado permiten establecer las siguientes conclusiones generales:

1. A partir de las cepas de *Ochroconis-Scolecobasidium*, previamente aisladas de manchas negras de la cueva de Lascaux, se identificaron dos nuevas especies, *O. lascauxensis* y *O. anomala*, de acuerdo con su caracterización morfológica y molecular. La especie mayoritaria fue *O. lascauxensis*, dominante en las manchas negras de las paredes y bóvedas de roca caliza.
2. La técnica de PCR a tiempo real, desarrollada para la detección y cuantificación de *O. lascauxensis*, demostró su elevada especificidad y sensibilidad, confirmando su validez para el análisis de muestras ambientales. Las cuantificaciones en manchas, sedimentos y aire indicaron que esta especie se encontraba ampliamente distribuida en la cueva de Lascaux y asociada al fenómeno de las manchas negras.
3. Los tratamientos biocidas aplicados a las manchas desarrolladas sobre la roca caliza resultaron ineficaces. Aunque disminuyeron la población de *O. lascauxensis*, ésta continuó siendo mayoritaria, y además produjeron un incremento significativo de la diversidad fúngica ocasionado por la colonización de hongos presentes en el aire de la cueva.
4. Las comunidades fúngicas mayoritarias, en manchas negras sobre sustrato arcilloso, correspondieron a especies de “levaduras negras”, principalmente del género *Exophiala*. La especie *Acremonium nepalense* también presentó una abundancia significativa, especialmente asociada a las manchas de color negro. Ambos taxones se detectaron metabólicamente activos.

5. *Ochroconis lascauxensis* no fue uno de los hongos mayoritarios en las manchas negras sobre sustrato arcilloso. Aunque esta especie se aisló de este tipo de manchas, según la caracterización molecular su abundancia fue menor que en manchas sobre calizas.
6. Se detectaron un total de ocho especies de “levaduras negras”, seis de las cuales podrían ser especies actualmente desconocidas, y las otras dos se identificaron como *Exophiala moniliae* y *Exophiala castellanii*, descritas como patógenos humanos.
7. El origen y la abundancia de las especies de *Ochroconis*, “levaduras negras” y *A. nepalense* en la cueva de Lascaux puede estar relacionado con los continuos tratamientos biocidas aplicados, y con la introducción de carbono orgánico disuelto en el agua de percolación. Ambos procesos pueden aportar fuentes nutricionales como los alquilbencenos y los fenoles derivados de la biodegradación de la lignina.
8. Los análisis SERS demostraron la participación de la melanina de *O. lascauxensis* en la formación de las manchas negras de la cueva de Lascaux, y pusieron de manifiesto el papel que juegan los colémbolos (*Folsomia candida*) en el enriquecimiento de las manchas en melanina, no digerida y dispersada en sus deyecciones.
9. El origen de las manchas negras es diferente según el sustrato donde aparecen: sobre la roca caliza se deben a la acumulación de melanina fúngica, y sobre los sedimentos arcillosos se producen fundamentalmente por la deposición biogénica de óxidos de manganeso. Se ha demostrado que la especie *A. nepalense* induce esta oxidación.

10. A partir de los resultados obtenidos podrán arbitrarse medidas para controlar el desarrollo de los hongos en los distintos nichos de la cueva, que no necesariamente deben llevar al uso continuado de biocidas, sino a adoptar medidas de conservación preventivas, como el control de los aportes de nutrientes a la cueva, la disminución de materia orgánica disuelta que llega a la cueva mediante percolación, estudios ambientales, microbiológicos y geológicos, etc.



BIBLIOGRAFÍA

- Abbott EV (1927). *Scolecobasidium*, a new genus of soil fungi. *Mycologia* 19: 29-31.
- Ajello L, McGinnis MR, Camper J (1977). An outbreak of phaeohyphomycosis in rainbow trout caused by *Scolecobasidium humicola*. *Mycopathologia* 62: 15-22.
- Alabouvette C, Bastian F, Saiz-Jimenez C (2011). Microbial ecology of Lascaux Cave. In: Coye N (ed). *Lascaux and Preservation Issues in Subterranean Environments. Proceedings of the International Symposium (Paris 26 and 27 february 2009)*. Documents d'archéologie française 105: 253-260. Éditions de la Maison des sciences de l'home, Paris, France.
- Allemand L (2003). Qui sauvera Lascaux? *La Recherche* 363: 26-33.
- Allemand L, Bahn PG (2005). Best way to protect rock art is to leave it alone. *Nature* 433: 800.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-10.
- Anderson IC, Parkin PI (2007). Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. *Journal of Microbiological Methods* 68: 248-253.
- Atlas RM (2010). *Handbook of Microbiological Media*. 4th ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- Atkinson RG (1952). A new species of *Heterosporium* from soil. *Mycologia* 44: 813-822.

- Aujoulat N (2004). Lascaux: Le geste, l'espace et le temps. Editions du Seuil, Paris.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds.) (2003). Current Protocols in Molecular Biology. Wiley, New York.
- Bahn PG (2008). Killing Lascaux. Inept bureaucrats and creeping fungi are destroying the world's most famous cave paintings. *Archaeology* 61, May/June 2008.
- Barron GL, Busch LV (1962). Studies on the soil hyphomycete *Scolecobasidium*. *Canadian Journal of Botany* 40: 77-84.
- Barron G (1968). The Genera of Hypfomycetes from Soil. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA.
- Bastian F, Oriol G, François A, Alabouvette C (2007). La grotte de Lascaux un écosystème complexe où bactéries et champignons interagissent. *Biofutur* 283: 28-31.
- Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C (2009a). The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1456-1462.
- Bastian F, Alabouvette C, Jurado V, Saiz-Jimenez C (2009b). Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave. *Naturwissenschaften* 96: 863-868.
- Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C (2009c). Bacteria and free-living amoeba in Lascaux Cave. *Research in Microbiology* 160: 38-40.

- Bastian F, Alabouvette C (2009d). Lights and shadows on the conservation of a rock art cave: the case of Lascaux Cave. *International Journal of Speleology* 38: 55-60.
- Bastian F, Jurado V, Novakova A, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C (2010). The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology* 156: 644-652.
- Bienapfl JC, Malvick DK, Percich JA (2011). Specific molecular detection of *Phytophthora sojae* using conventional and real-time PCR. *Fungal Biology* 115: 733-740.
- Bosák P, Vašátko J, Čílek V, Dumnická E, Hanuláková D, Horáček I, Jeník J, Kopecký J, Marvanová L, Mlejnek R, Růžicka V, Zacharda M (2001). Czech Republic. In: Jubertie C, Decu V (eds.) *Encyclopedia Biospeleologica*: 1405-1426. Société Biospéologie, Moulis-Bucharest.
- Bromfield SM, Skerman VBD (1950). Biological oxidation of manganese in soils. *Soil Science* 69: 337-347.
- Butler D (2010). French bid to save rock art. *Nature* 467: 375.
- Cahyani VR, Murase J, Ishibashi E, Asakawa S, Kimura M (2009). Phylogenetic positions of Mn²⁺-oxidizing bacteria and fungi isolated from Mn nodules in rice field subsoils. *Biology and Fertility of Soils* 45: 337-346.
- Cañamares MV, Garcia-Ramos JV, Gomez-Varga JD, Domingo C, Sanchez-Cortes S (2005). Comparative study of the morphology, aggregation, adherence to glass, and surface-enhanced Raman scattering activity of silver nanoparticles prepared by chemical reduction of Ag⁺ using citrate and hydroxylamine. *Langmuir* 21: 8546-8553.

- Centeno S, Shamir J (2008). Surface enhanced Raman scattering (SERS) and FTIR characterization of the sepia melanin pigment used in works of art. *Journal of Molecular Structure* 873: 149-159.
- Chaturvedi S, Rudd RJ, Davis A, Victor TR, Li X, Appler KA, Rajkumar SS, Chaturvedi V (2011). Rapid real-time PCR assay for culture and tissue identification of *Geomyces destructans*: the etiologic agent of bat geomycosis (white nose syndrome). *Mycopathologia* 172: 247-256.
- Chelius MK, Moore JC (2004). Molecular phylogenetic analysis of Archaea and Bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal* 21: 123-134.
- Chemidlin Prévost-Bouré N, Christen R, Dequiedt S, Mougél C, Lelièvre M, Jolivet C, Shahbazkia HR, Guillou L, Arrouays D, Ranjard L (2011). Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS ONE* 6: (DOI: 10.1371/journal.pone.0024166).
- Comerio RM, Pildain MB, Romero AI (2005). Nuevos contaminantes fúngicos de productos alimenticios en Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología* 22: 50-53.
- Cortesia C, Lopez GJ, de Waard JH, Takiff HE (2010). The use of quaternary ammonium disinfectants selects for persisters at high frequency from some species of non-tuberculous mycobacteria and may be associated with outbreaks of soft tissue infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65: 2574-2581.
- Cox HHJ, Houtman JHM, Doddema HJ, Harder W (1993). Growth of the black yeast *Exophiala jeanselmei* on styrene and styrene-related compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 39: 372-376.

- dela Cruz TEE (2006a). Marine *Dendryphiella* species from different geographical locations: an integrated, polyphasic approach to its taxonomy and physioecology (PhD thesis). Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig.
- dela Cruz TEE, Schulz BE, Kubicek CP, Druzhinina IS (2006b). Carbon source utilization by the marine *Dendryphiella* species *D. arenaria* and *D. salina*. FEMS Microbiology Ecology: 58: 343-353.
- Cunningham KI, Northup DE, Pollastro RM, Wright WG, LaRock EJ (1995). Bacteria, fungi and biokarst in Lechuguilla Cave, Carlsbad Caverns National Park, New Mexico. Environmental Geology 25: 2-8.
- Daxboeck F, Stadler M, Assadian O, Marko E, Hirschl AM, Koller W (2005). Characterization of clinically isolated *Ralstonia mannitolilytica* strains using random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing and antimicrobial sensitivity, and comparison of the classification efficacy of phenotypic and genotypic assays. Journal of Medical Microbiology 54: 55-61.
- Doty MS, Slater DW (1946). A new species of *Heterosporium* pathogenic on young chinook salmon. The American Midland Naturalist Journal 36: 663-665.
- Di Piazza M (2007). The crisis in Lascaux: update March 2007. Rock Art Research 24: 136-137.
- Docampo S, Trigo MM, Recio M, Melgar M, García-Sánchez J, Cabezudo B (2011). Fungal spore content of the atmosphere of the Cave of Nerja (southern Spain): diversity and origin. Science of the Total Environment 409: 835-843.

- Domsch KH, Gams W, Anderson T-H (2007). Compendium of soil fungi. Vol 1, 2nd ed. Academic Press, London.
- Dupont J, Jacquet C, Denetiere B, Lacoste S, Bousta, F, Orial G, Cruaud C, Couloux A, Roquebert M.-F (2007). Invasion of the french paleolithic painted cave of Lascaux by members of the *Fusarium solani* species complex. Mycologia 99: 526-533.
- Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32: 1792-1797.
- Ertl A, Pertlik F, Prem M, Pos, JE, Kim SJ, Brandstätter F, Alfschuster R (2005). Ranciéite crystals from Friesach, Carinthia, Austria. European Journal of Mineralogy 17: 163-172.
- Felsenstein J (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.5c; Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Feng XH, Zhu M, Ginder-Vogel M, Ni C, Parikh SJ, Sparks DL (2010). Formation of nano-crystalline todorokite from biogenic Mn oxides. Geochimica et Cosmochimica Acta 74: 3232-3245.
- Fernandez-Cortes A, Cuezva S, Sanchez-Moral S, Cañaveras JC, Porca E, Jurado V, Martín-Sánchez PM, Saiz-Jiménez C (2011). Detection of human-induced environmental disturbances in a show cave. Environmental Science Pollution Research 18: 1037-1045.
- Fox JL (2008). Some say Lascaux Cave paintings are in microbial “crisis” mode. Microbe 3: 110-112.

- Friedrich AJ, Hasenmueller EA, Catalano JG (2011). Composition and structure of nanocrystalline Fe and Mn oxide cave deposits: Implications for trace element mobility in karst systems. *Chemical Geology* 284: 82-96.
- Gams W (1975). *Cephalosporium*-like Hyphomycetes: Some tropical species. *Transactions of the British Mycological Society* 64: 389-404.
- García-Martos P, Márquez A, Gené J (2002). Infecciones humanas por levaduras negras del género *Exophiala*. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 72-79.
- Ge YP, Lv GX, Shen YN, Li M, Deng SW, de Hoog GS, Samerpitak K, Liu WD (2012). First report of subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Ochroconis tshanytschae* in an immunocompetent patient. *Medical Mycology*. (DOI: 10.3109/13693786.2011.653834)
- Geneste J-M (2006). De la découverte à la première crise bioclimatique de 1963. *Monumental* 2: 62-67.
- Geneste J-M (2008). Lascaux. Conservation d'une grotte ornée. *Les Dossiers d'Archéologie* 15: 68-79.
- Geneste J-M (2011). The major phases in the conservation of Lascaux Cave. In: Coye N (ed). *Lascaux and Preservation Issues in Subterranean Environments. Proceedings of the International Symposium (Paris 26 and 27 february 2009)*. *Documents d'archéologie française* 105: 51-71. Éditions de la Maison des sciences de l'home, Paris, France.
- van Ginkel G, van Dijk JB, Kroon AG (1992). Metabolism of hexadecyltrimethylammonium chloride in *Pseudomonas* strain B1. *Applied and Environmental Microbiology* 17: 1145-1151.

- Glory A, Delluc B, Delluc G (2008). Les recherches à Lascaux (1952–1963). Gallia Préhistoire XXXIX: 201.
- Godoy G, Rodríguez-Kábana R, Morgan-Jones G (1982). Parasitism of eggs of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* by fungi isolated from cysts of *H. glycines*. Nematropica 12: 111-119.
- Gorbushina AA, Lyalikova NN, Vlasov DY, Khizhnyak TV (2002). Microbial communities on the monuments of moscow and St. Petersburg: Biodiversity and trophic relations. Microbiology 71: 350-356 (Translated from Mikrobiologiya 71: 409–417).
- Graff J (2006). Saving beauty. Time, 15 May 2006, 36–42.
- Grandi RAP, Gusmão LFP (2002). Decomposing Hyphomycetes on leaf litter of *Tibouchina pulchra* Cogn. Revista Brasileira de Botânica 25: 79-87.
- Graniti A (1963). *Scolecobasidium anellii* n. sp., agente di annerimenti superficiali di stalattiti. Bollettino della Società Botanica Italiana 69: 360-365.
- Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. Applied and Environmental Microbiology 66: 5488-5491.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

- Hamada N (2005a). Characteristics of fungi growing inside washing machines. *Journal of Urban Living Health Association* 49: 108-113.
- Hamada N (2005b). Growth on various detergent components of fungi found in washing machines. *Journal of Urban Living Health Association* 49: 161-167.
- Hamada N, Abe N (2008). Characteristics of recent fungal contamination in bathrooms. *Journal of Urban Living Health Association* 52: 98-106.
- Hamada N, Abe N (2009a). Fungal growth on anion surfactant medium. *Biocontrol Science* 14: 177-180.
- Hamada N, Abe N (2009b). Physiological characteristics of 13 common fungal species in bathrooms. *Mycoscience* 50: 421-429.
- Hamayun M, Khan SA, Kim HY, Chaudhary MF, Hwang YH, Shin DH, Kim IK, Lee BH, Lee IJ (2009). Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *Scolecobasidium tshanytschae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 560-565.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985). Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.
- Haugland RA, Varma M, Wymer LJ, Vesper SJ (2004). Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 198-210.

- Hegstad K, Langsrud S, Lunestad BT, Scheie AA, Sunde M, Yazdankhah SP (2010). Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microbial Drug Resistance* 16: 91-104.
- de Hoog GS, von Arx, JA (1973). Revision of *Scolecobasidium* and *Pleurophragmium*. *Kavaka* 1: 55-60.
- de Hoog GS, Hermanides-Nijhof EJ (1977). The black yeasts and allied Hyphomycetes. *Studies in Mycology* 15: 1-222.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ (2000). Atlas of clinical fungi. CBS/Universitat Rovira i Virgili, Utrecht & Reus.
- Horré R, de Hoog GS (1999). Primary cerebral infections by melanised fungi: a review. *Studies in Mycology* 43: 176-193.
- Horré R, de Hoog GS, Kluczny C, Marklein G, Schaal KP (1999). rDNA diversity and physiology of *Ochroconis* and *Scolecobasidium* species reported from humans and other vertebrates. *Studies in Mycology* 43: 194-205
- Iwatsu T, Nishimura K, Miyaji M (1984). *Exophiala castellanii* sp. nov. *Mycotaxon* 20: 307-314.
- Iwatsu T, Udagawa S, Takase T (1991). A new species of *Exophiala* recovered from drinking water. *Mycotaxon* 41: 321-328.
- Jurado V, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C (2008). Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage. A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62: 325-330.

- Jurado V, Fernandez-Cortes A, Cuezva S, Laiz L, Cañaveras JC, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C (2009). The fungal colonisation of rock-art caves: experimental evidence. *Naturwissenschaften* 96: 1027-1034.
- Jurado V, Porca E, Cuezva S, Fernandez-Cortes A, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C (2010). Fungal outbreak in a show cave. *Science of the Total Environment* 408: 3632-3638.
- Kaarakainen P, Rintala H, Vepsäläinen A, Hyvärinen A, Nevalainen A, Meklin T (2009). Microbial content of house dust samples determined with qPCR. *Science of the Total Environment* 407: 4673-4680.
- Kawaguchi T, Decho AW (2002). In situ analysis of carboxyl (-COOH) and sulfhydryl (-SH) groups of extracellular polymeric secretions (EPS) by confocal scanning laser microscopy. *Analytical Biochemistry* 304: 266-267.
- Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kirilenko TS, Al-Akhmed MA (1977). *Ochroconis tshanytschae* (Doty et Slater) comb. nov. *Mikrobiologicheskyy Zhurnal* 39: 303-306.
- Kiyuna T, An KD, Kigawa R, Sano C, Miura S, Sugiyama J (2010). Molecular assessment of fungi in “black spots” that deface murals in the Takamatsuzuka and Kitora tumuli in Japan: *Acremonium* sect. *Gliomastix* including *Acremonium tumulicola* sp. nov. and *Acremonium felinum* comb. nov. *Mycoscience* 52: 1-17.

- Koilraj AJ, Marimuthu G, Natarajan K, Saravanan S, Maran P, Hsu MJ (1999). Fungal diversity inside caves of Southern India. *Current Science* 77: 1081-1084.
- Kroon AG, Pomper MA, van Ginkel G (1994). Metabolism of dodecyldimethylamine of *Pseudomonas* MA3. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42: 134-139.
- Krumbein WE, Urzì C (1991). Biologically induced decay phenomena of antique marbles – some general considerations. In: Decrouez D, Chamay J, Zezza F (eds.). *Proceedings of the 2nd International Symposium on the conservation of monuments in the Mediterranean Basin*, Geneve (Switzerland): 219-235. Ville de Geneve-Museum d'Histoire Naturelle & Musee D'Art et d'Histoire.
- Lane DJ (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackenbrandt E, Goodfellow M (eds.) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*: 115-175. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, UK.
- Langsrud S, Sundheim G (1997). Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *Journal of Applied Microbiology* 82: 705-712.
- Langsrud S, Sundheim G, Borgmann-Strahsen R (2003). Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology* 95: 874-882.
- Lastennet R, Lopez B, Denis A, Mertz J-D (2011). Hydrogeology, infiltration water characteristics and support properties at Lascaux. In: Coye N (ed). *Lascaux and Preservation Issues in Subterranean Environments. Proceedings of the International Symposium (Paris 26 and 27 february 2009)*. Documents d'archéologie française 105: 95-120. Éditions de la Maison des sciences de l'home, Paris, France.

- Lefèvre M (1974). La maladie verte de Lascaux. *Studies in Conservation* 19: 126-156.
- Lichfield J (2008). Six months to save Lascaux. *The Independent*, 12 July 2008.
- Liu YJ, Whelen S, Hall BD (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: Evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16:1799-1808.
- Liu HM, Zhang TY (2004). A preliminary report of soil dematiaceous hyphomycetes from the Yellow River delta I. *Mycosistema* 23: 338-344.
- Lugauskas A, Krikstaponis A, Seskauskas V (2003). Species of conditionally pathogenic micromycetes in the air of dwellings and occupational premises. *Indoor and Built Environment* 12: 167-177.
- Malaurent P, Lacanette D, Brunet J, Riss J (2011). Climatology of the subterranean environment at Lascaux: from a global study to the microclimatology of the cave walls. In: Coye N (ed). *Lascaux and Preservation Issues in Subterranean Environments. Proceedings of the International Symposium (Paris 26 and 27 february 2009). Documents d'archéologie française* 105: 121-142. Éditions de la Maison des sciences de l'home, Paris, France.
- Maraun M, Martens H, Migge S, Theenhaus A, Scheu S (2003). Adding to 'the enigma of soil animal diversity': fungal feeders and saprophagous soil invertebrates prefer similar food substrates. *European Journal of Soil Biology* 39: 85-95.

- Martin F, Saiz-Jimenez C, Cert A (1979). Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of soil humic fractions. II. The high boiling point compounds. *Soil Science Society of America Journal* 43: 309-312.
- Matsumoto T, Padhye AA, Ajello L (1987). Medical significance of the so-called black yeast. *European Journal of Epidemiology* 3: 87-95.
- McBain AJ, Ledder RG, Moore LE, Catrenich CE, Gilbert P (2004). Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3449-3456.
- McGinnis MR, Ajello L (1974). *Scolecobasidium tshanytschae*. *Transaction of the British Mycological Society* 63: 202-203.
- McGinnis MR, Ajello L (1975). *Scolecobasidium macrosporum* as a synonym of *Scolecobasidium tshanytschae*. *Mycotaxon* 2: 132-134.
- Michaelsen A, Pinzari F, Ripka K, Lubitz W, Piñar G (2006). Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58: 133-141.
- Middelhoven WJ (1993). Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeasts and yeastlike fungi. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 63: 125-144.
- Miller L, Berger T (1985). Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acids. *Hewlett-Packard application note*: 228-41. Hewlett-Packard Co., Avondale, Pa.

- Mita N, Miura H (2003). Evidence of microbial activity in the formation of manganese wads at the Asahidake hot spring in Hokkaido, Japan. *Resource Geology* 53: 233-238.
- Miyata N, Tani Y, Iwahori K, Soma M (2004). Enzymatic formation of manganese oxides by an *Acremonium*-like hyphomycete fungus, strain KR21-2. *FEMS Microbiology Ecology* 47: 101-109.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding of 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Muyzer G, Smalla K (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 73: 127-141.
- Nagai K, Ohta S, Zenda H, Matsumoto H, Makino M (1996). Biochemical characterization of a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from a benzalkonium chloride solution. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19: 873-875.
- Nieves-Rivera AM (2003). Mycological survey of Río Camuy Caves Park, Puerto Rico. *Journal of Cave and Karst Studies* 65: 23-28.
- Nishiyama N, Okamoto T, Nishiyama N (2000). Biodegradation of dodecyltrimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology* 88: 641-647.

- Nováková A (2009). Microscopic fungi from the Domica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia). A review. *International Journal of Speleology* 38: 71-82.
- Oriel G, Mertz J-D (2006). Étude et suivi des phénomènes microbiologiques. *Monumental* 2: 76-86.
- Oriel G, Bousta F, Francois A, Pallot-Frossard I, Warscheid T (2011). Managing biological activities in Lascaux: identification of microorganisms, monitoring and treatments In: Coye N (ed). *Lascaux and Preservation Issues in Subterranean Environments. Proceedings of the International Symposium (Paris 26 and 27 february 2009). Documents d'archéologie française* 105: 219-251. Éditions de la Maison des sciences de l'home, Paris, France.
- Orłowska M, Lengiewicz I, Suszycka M (2004). Hyphomycetes developing on water plants and bulrushes in fish ponds. *Polish Journal of Environmental Studies* 13: 703-707.
- Ostwald J (1984). Two varieties of lithiophorite in some Australian deposits. *Mineralogical Magazine* 48: 383-388.
- Patrauchan MA, Oriel PJ (2003) Degradation of benzyldimethylalkylammonium chloride by *Aeromonas hydrophila* sp. K. *Journal of Applied Microbiology* 94: 266-272.
- Pinholt Y, Struwe S, Kjeller A (1979). Microbial changes during oil decomposition in soil. *Holarctic Ecology* 2: 195-200.
- Piontelli E, Giusiano G, Casanova D (2005). Comunidad estacional de microhongos en la litera de coníferas del N.E. argentino: Énfasis en taxa de potencial interés medico. *Boletín Micológico* 20: 15-27.

- Porca E (2011). Aerobiología: mecanismos de dispersión de los microorganismos en cuevas turísticas. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, España.
- Porca E, Jurado V, Martín-Sánchez PM, Hermosin B, Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jiménez C (2011). Aerobiology: an ecological indicator for early detection and control of fungal outbreaks in caves. *Ecological Indicators* 11: 1594-1598.
- Prenafeta-Boldú FX, Kuhn A, Luykx D, Anke H, van Groenestijn JW, de Bont JAM (2001). Isolation and characterisation of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycological Research* 105: 477-484.
- Prenafeta-Boldú FX, Summerbell R, de Hoog GS (2006). Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiology Reviews* 30: 109-130.
- Regaieg H, Ciancio A, Raouani NH, Grasso G, Rosso L (2010). Effects of culture filtrates from the nematophagous fungus *Verticillium leptobactrum* on viability of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 2285-2289.
- Revankar SG, Sutton DA (2010). Melanized fungi in human disease. *Clinical microbiology Reviews* 23: 884-928.
- de Roux E (2007). Les fresques de Lascaux menacées par des moisissures. *Le Monde*, 26 November 2007.
- Roy RY, Dwivedi RS, Mishra RR (1962). Two new species of *Scolecobasidium* from soil. *Lloydia* 25: 164-166.

- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Saiz-Jimenez C, Haider K, Martin JP (1975). Antraquinones and phenols as intermediates in the formation of dark-coloured, humic acid-like pigments by *Eurotium echinulatum*. *Proceedings - Soil Science Society of America* 39: 649-653.
- Saiz-Jimenez C, Hawkins BL, Maciel GE (1986). Cross polarization, magic-angle spinning ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy of soil humic fractions. *Organic Geochemistry* 9: 277-284.
- Saiz-Jimenez C (1994a). Modern concepts on the origin and structure of terrestrial humic substances: the alkylaromatic network approach. In: Senesi N, Miano TM (eds.). *Humic substances in the global environment and implications on human health*: 71-90. Elsevier, Amsterdam.
- Saiz-Jimenez C (1994b). Pyrolysis/methylation of soil fulvic acids: benzenecarboxylic acids revisited. *Environmental Science and Technology* 28: 197-200.
- Saiz-Jimenez C (1994c). Analytical pyrolysis of humic substances: pitfalls, limitations, and possible solutions. *Environmental Science and Technology* 28: 1173-1780.
- Saiz-Jimenez C (1995). Microbial melanins in stone monuments. *The Science of the Total Environment* 167: 273-286.

- Saiz-Jimenez C (1996). The chemical structure of humic substances: recent advances. In: Piccolo A (Ed). Humic Substances in Terrestrial Ecosystems: 1-44. Elsevier, Amsterdam.
- Saiz-Jimenez C, Hermosin B (1999). The nature of the organic matter present in dripping waters from Altamira cave. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 49: 337-347.
- Santelli CM, Webb SM, Dohnalkova AC, Hansel CM (2011). Diversity of Mn oxides produced by Mn(II)-oxidizing fungi. Geochimica et Cosmochimica Acta 75: 2762-2776.
- Saratovsky I, Wightman PG, Pastén PA, Gaillard J-F, Poeppelmeier KR (2006). Manganese oxides: Parallels between abiotic and biotic structures. Journal of the American Chemical Society 128: 11188-11198.
- Schloss PD, Handelsman J (2005). Introducing species richness DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating. Applied and Environmental Microbiology 71: 1501-1506.
- Seyedmousavi S, Badali H, Chlebicki A, Zhao J, Prenafeta-Boldú FX, de Hoog GS (2011). *Exophiala sideris*, a novel black yeast isolated from environments polluted with toxic alkyl benzenes and arsenic. Fungal Biology 115: 1030-1037.
- Simons M (2007). Fungus once again threatens French cave paintings. New York Times, 9 December 2007.
- Sire M-A (2006). De l'élimination des champignons au constat d'état. Monumental 2: 68-75.

- Sire M-A (2008). Lascaux. À la recherche d'une nouvelle stratégie de conservation préventive. Les Dossiers d'Archéologie 15: 54-63.
- Smith CJ, Osborn AM (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. FEMS Microbiology Ecology 67: 6-20.
- Snaird J, Amann R, Huber I, Ludwig W, Schleifer K-H (1997). Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. Applied and Environmental Microbiology 63: 2884-2896.
- Spilde MN, Northup DE, Boston PJ, Schelble RT, Dano KE, Crossey LJ, Dahm CN (2005). Geomicrobiology of cave ferromanganese deposits: a field and laboratory investigation. Geomicrobiology Journal 22: 99-116.
- Stelzmueller I, Biebl M, Wiesmayr S, Eller M, Hoeller E, Fille M, Weiss G, Lass-Floerl C, Bonatti H (2006). *Ralstonia pickettii* –innocent bystander or a potential threat? Clinical Microbiology and Infection 12: 99-101.
- Takano K, Itoh Y, Ogino T, Kurosawa K, Sasaki K (2006). Phylogenetic analysis of manganese-oxidizing fungi isolated from manganese-rich aquatic environments in Hokkaido, Japan. Limnology 7: 219-223.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
- Tebo BM, Bargar JR, Clement BG, Dick GJ, Murray KJ, Parker D, Verity R, Webb SM (2004) Biogenic manganese oxides: Properties and mechanisms of formation. Annual Review of Earth and Planetary Sciences. 32: 287-328.

- Tebo BM, Johnson HA, McCarthy JK, Templeton AS (2005). Geomicrobiology of manganese (II) oxidation. *Trends in Microbiology* 13: 421-428.
- Tezel U, Pavlostathis SG (2009). Transformation of benzalkonium chloride under nitrate reducing conditions. *Environmental Science and Technology* 43: 1342-1348.
- Timonin MI, Illman WI, Hartgerink T (1972). Oxidation of manganous salts of manganese by soil fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 18: 793-799.
- Trifonova Z, Karadjova J (2003). Fungal parasitism of the cysts and eggs of the *Globodera rostochiensis*. *Journal of Agricultural Sciences* 48: 103-110.
- Upadhyay HP (1966). Soil fungi from North-East Brazil V. Two fungi parasitic on nematodes. Instituto de Micologia, Universidade do Recife, No. 493.
- Urzi C (2004). Microbial deterioration of rocks and marble monuments in Mediterranean Basin: A review. *Corrosion Reviews* 22: 441-457.
- Vaneechoutte M, De Baere T, Wauters G, Steyaert S, Claeys G, Vogelaers D, Verschraegen G (2001). One case each of recurrent meningitis and hemoperitoneum infection with *Ralstonia mannitolilytica*. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 4588-4590.
- VanSteenhouse JL, Padhye AA, Ajello L (1988). Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Scolecobasidium humicola* in a cat. *Mycopathologia* 102: 123-127.

- Vaughan MJ, Maier RM, Pryor BM (2011). Fungal communities on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, Arizona, USA. *International Journal of Speleology* 40: 65-77.
- Wang W, Maa X, Maa Y, Maoa L, Wu F, Maa X, An L, Feng H (2010). Seasonal dynamics of airborne fungi in different caves of the Mogao Grottoes, Dunhuang, China. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64: 461-466.
- Weitzman I, Rosenthal, SA, Shupack JL (1985). A comparison between *Dactylaria gallopava* and *Scolecobasidium humicola*: first report of an infection in a tortoise caused by *S. humicola*. *Sabouraudia* 23: 287-293.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*: 315–322. Academic Press, USA.
- Wollenzien U, de Hoog GS, Krumbein WE, Urzi C (1995). On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *The Science of the Total Environment* 167: 287-294.
- Wu ZM, Zhang TZ (2008). Soil dematiaceous hyphomycetes from Dahingganling Mountain Range, Inner Mongolia, China I. *Mycosystema* 27: 5-15.
- Young ME, Alakomi HL, Fortune I, Gorbushina AA, Krumbein WE, Maxwell I, McCullagh C, Robertson P, Saarela M, Valero J, Vendrell M (2008). Development of a biocidal treatment regime to inhibit biological growths on cultural heritage: BIODAM. *Environmental Geology* 56: 631-641.

- Zabielska-Matejuk J, Czaczyk K (2006). Biodegradation of new quaternary ammonium compounds in treated wood by mould fungi. *Wood Science and Technology* 40: 461-475.
- Zeng JS, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Harrak MJ, de Hoog GS (2007). Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 3713–3720.
- Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Ameena Nalim F, Summerbell RC, Padhye AA, Geiser DM (2006). Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 2186-2190.
- Zhao J, Zeng J, de Hoog GS, Attili-Angelis D, Prenafeta-Boldú FX (2010). Isolation and identification of black yeasts by enrichment on atmospheres of monoaromatic hydrocarbons. *Microbial Ecology* 60: 149-156.